

FR 99/00316

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**COPIE OFFICIELLE****PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **26 FEV. 1999**Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets**Martine PLANCHE****INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE****SIEGE**
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

13 FEV 1998

98 01742 -

13 FEV 1998

1

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET REGIMBEAU
26, Avenue Kléber
75116 PARIS

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire



demande initiale

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

235442 016955 NIP

01 45 00 92 02

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Acide nucléique comprenant la séquence d'un promoteur inductible par un stress et une séquence d'un gène codant pour une stilbène synthase, cellule et plante transformées par cet acide nucléique

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

1. L V M H RECHERCHE

2. BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

Forme juridique

GROUPEMENT D'INTERET ECONOMIQUE, .

Nationalité (s)

1. Française, 2. Allemande

Adresse (s) complète (s)

1. 25, rue des Peupliers 92752 NANTERRE,
2. D-51360 LEVERKUSEN

Pays

FR
DE

4 INVENTEUR (S)

Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande

n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION :

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

Handwritten signature: F. Amst

Handwritten signature: [Signature]

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

7801742

TITRE DE L'INVENTION : Acide nucléique comprenant la séquence d'un promoteur inductible par un stress et une séquence d'un gène codant pour une stilbène synthase, cellule et plante transformées par cet acide nucléique

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

L V M H RECHERCHE
BAYER AKTIENGESellschaft
25, rue des Peupliers 92752 NANTERRE, D-51368 LEVERKUSEN

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

COUTOS-THEVENOT Pierre
40, rue Mouffetard
75008 Paris, FR

HAIN Rüdiger
TALSTRASSE 53a
40764 Langenfeld, DE

SCHREIER Peter
Dasselstrasse 1
50674 KÖLN, DE

BOULAY Michel
60, rue de Vaux
77000 Livry sur Seine, FR

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

13 février 1998

CABINET REGIMBEAU

[Signature]
221153

La présente invention concerne des plantes présentant des résistances améliorées à certains agents pathogènes sensibles aux stilbènes, et concerne plus particulièrement un ensemble de constructions associant un promoteur végétal inductible par un stress biotique, engendré notamment par lesdits pathogènes, à un ou des gène(s) codant pour une stilbène synthase.

Une grande partie de la récolte mondiale de plantes cultivées est constamment détruite par les parasites et les pathogènes. Parmi les possibilités permettant de diminuer ou d'empêcher l'attaque des plantes cultivées par ces parasites, la lutte chimique (traitements phytosanitaires) est la méthode la plus utilisée. Néanmoins, l'application de produits chimiques n'est pas sans conséquence pour l'environnement et pose parfois des problèmes technologiques comme par exemple l'apparition de nouvelles souches pathogènes résistantes ou, dans le domaine de l'oenologie, les difficultés qui peuvent survenir au cours des fermentations (l'utilisation d'inhibiteurs de la biosynthèse des stérols peut bloquer la croissance des levures en fin de fermentation) ou la présence de produits chimiques retrouvés parfois dans les vins comme la procymidone, produit anti-*Botrytis*.

Pour pallier les inconvénients liés à la lutte chimique, la méthode de lutte consistant à améliorer la résistance des plantes cultivées aux maladies provoquées par ces pathogènes a été envisagée. Il est possible par exemple, dans une première approche, d'obtenir cette amélioration par voie sexuée, par la génétique classique, en hybridant les plantes dont on veut améliorer la résistance avec des variétés tolérantes. Néanmoins, cette approche n'est pas toujours réalisable (variété naturelle tolérante non connue) ou n'est pas autorisée par la législation comme par exemple en viticulture de par la législation française sur les Appellations d'Origine Contrôlée (A.O.C.) qui limite les cépages à utiliser pour une appellation donnée.

Dans une deuxième approche, il est possible, en utilisant les techniques modernes de la biologie cellulaire et moléculaire, d'intégrer dans le génome de la plante un ou plusieurs gènes homologues ou hétérologues permettant la surexpression ou l'expression d'une molécule d'intérêt de nature protéique afin d'augmenter la production d'un métabolite ou d'une voie métabolique ou d'ouvrir une nouvelle voie de biosynthèse ou de synthétiser une nouvelle molécule permettant par exemple d'accroître l'ouverture d'une nouvelle voie de biosynthèse, permettant par exemple d'accroître la résistance de la plante en renforçant ses mécanismes de défense vis-à-vis des pathogènes en cause.

Chez les végétaux, ces mécanismes de défense sont de plusieurs ordres. Les uns peuvent être considérés comme passifs et sont liés aux caractéristiques physico-chimiques des cellules, des tissus épidermiques et/ou des organes de la plante. Les autres appartiennent à la dynamique des interactions gène à gène (gènes de résistance du végétal et d'avirulence du pathogène, mécanismes des interactions hôte-pathogène). Ces interactions peuvent conduire au développement de la réaction d'hypersensibilité (mort rapide des cellules du végétal autour du point d'infection pour bloquer la colonisation de la plante par le micro-organisme) mais aussi à la synthèse et à l'accumulation de toute une série de composés. Parmi ceux-ci, certains peuvent être des constituants pariétaux, impliqués dans la formation d'une barrière « physique » autour du point d'infection (callose, lignine, protéine riche en hydroxyproline : HRGP, etc.), d'autres composés peuvent être des molécules aux fonctions antimicrobiennes plus ou moins bien définies (phytoalexines; protéines associées aux pathogènes : PR protéines (Pathogenesis Related protein), etc.). Parmi les molécules de type phytoalexines qui sont synthétisées et accumulées par les plantes lors, par exemple, des interactions hôte-pathogène, on trouve notamment les stilbènes qui sont toxiques, notamment pour les micro-organismes. Le terme de stilbène désigne un

groupe de substances chimiques possédant le squelette trans-diphényl-1,2-éthylène comme structure de base commune, le resvératrol et la pinosylvine étant parmi les plus simples. Ce squelette de base est synthétisé dans les plantes par une stilbène synthase ou des enzymes apparentées, à partir de substrats comme le malonyl-CoA, le cinnamoyl-CoA ou le coumaroyl-CoA, substances que l'on trouve dans toutes les plantes (précurseurs des flavonoïdes). Les gènes de stilbène synthase ou des enzymes apparentées ont été isolés, séquencés et clonés, notamment à partir de l'arachide, de l'orchidée et de la vigne. On a pu réaliser à partir de ces gènes la transformation de plantes telles que la pomme de terre, la luzerne ou le tabac, présentant, par comparaison aux plantes non transformées, une résistance supérieure à l'attaque par des pathogènes (EP-309862 ; EP-648839 ; MELCHIOR, F. et al., Arch. Biochem. Biophys. 1991, 288, 2, 552-557 ; WIESE, W. et al., Plant Mol. Biol. 1994, 26, 2, 667-677 ; HAIN, R. et al., Nature 1993, 361, 153-156).

L'expression ou la surexpression de ces molécules aux fonctions antimicrobiennes peut permettre d'obtenir une résistance « naturelle » des plantes en réponse à des stress, notamment des stress de type microbien. Cependant, une surexpression constitutive de ce type de protéines ne peut être envisagée sans inconvénient pour la plante (coût énergétique, ralentissement de la croissance, etc.) (FISCHER, R. et al., The plant Journal 1997, 11, 3, 489-498).

D'autre part, dans le cas de certaines plantes comme par exemple la vigne ou des plantes herbacées, on trouve des stilbènes uniquement dans certains tissus sains et à des concentrations très faibles. Par contre, à la suite d'une infection ou d'une lésion, ces stilbènes augmentent fortement au niveau du site infecté ou lésé, les gènes de stilbène synthase étant inductibles en conditions de stress biotique ou abiotique (par exemple blessures, ultraviolets, etc.).

Néanmoins, cette régulation est rarement présente chez les plantes d'intérêt agronomique ou lorsqu'elle est présente, elle peut ne pas être suffisamment efficace. Par exemple, dans le cas de la vigne, l'étude de la synthèse de phytoalexines a montré la présence de stilbènes, dont le resvératrol, dans les tissus sains seulement pour le bois. Dans les tissus de la baie de raisin, la présence de stilbènes est trouvée lorsque, d'une part, la baie est soumise à un stress comme l'attaque par un pathogène (*Botrytis cinerea* pour la pourriture grise ou *Plasmopora viticola* pour le Mildiou), et, d'autre part, uniquement jusqu'à la véraison du jeune fruit. En revanche, la concentration de stilbènes diminue fortement de la véraison à la maturation. Or, les dégâts dus par exemple à *Botrytis* sont rarement rencontrés jusqu'à la véraison mais plutôt lorsqu'on se situe près de la maturation de la baie. C'est pourquoi il est nécessaire de contrôler l'expression de gènes de stilbène synthase par des promoteurs forts, échappant à la régulation naturelle du gène, promoteurs devant être inductibles et en particulier inductibles par le stress lui-même. C'est précisément l'objet de la présente invention.

La présente invention concerne des acides nucléiques comprenant la séquence du promoteur d'une PR protéine de la luzerne associée à au moins une séquence d'un gène codant pour une stilbène synthase.

L'invention concerne particulièrement des acides nucléiques selon l'invention, caractérisés en ce que le promoteur d'une PR protéine de la luzerne est un promoteur inductible dans les plantes, tissus spécifiques ou non, par un stress biotique ou abiotique.

L'invention concerne également des acides nucléiques selon l'invention, caractérisés en ce que la séquence du promoteur d'une PR protéine de la luzerne est choisie dans le groupe comprenant :

- a) la séquence IND S1,

b) toute séquence correspondant à un fragment de la séquence IND S1 et ayant effet de séquence promotrice chez les plantes.

On préfère les séquences du promoteur d'une PR protéine de la luzerne qui présentent au moins 80 % d'homologie avec la séquence IND S1. Particulièrement préférées sont celles qui présentent au moins 90 % ou 95 % d'homologie avec ladite séquence.

Les séquences de promoteurs de PR protéines chez la luzerne selon l'invention ont été obtenues à partir des séquences régulatrices de gènes de PR protéines en mettant à profit la réponse incompatible (réaction d'hyper-sensibilité HR) obtenue dans la relation hôte-parasite entre la luzerne (*Medicago sativa*) et *Pseudomonas syringae* pv *pisi* pour isoler des séquences régulatrices de gènes responsables de cette réaction.

Lors de l'attaque de la luzerne par *Pseudomonas*, l'apparition d'une réaction de la plante est observée dans la zone voisine de la nécrose provoquée par l'infection bactérienne.

Le matériel végétal a donc été prélevé après l'attaque bactérienne afin de constituer une banque d'ADNc à partir des ARNs messagers produits dans les zones voisines de la nécrose. Une amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), utilisant des poly-nucléotides de synthèse correspondant à des motifs conservés de gènes de PR protéines de légumineuses, a permis d'obtenir une sonde radioactive qui a été ensuite utilisée pour sélectionner des transcrits dans la banque d'ADNc. Parmi ceux-ci, l'un d'entre eux (ADNc-PR7) a été retenu car, après séquençage, il présentait une bonne homologie avec des gènes équivalents codant pour des PR protéines, connus pour d'autres plantes (cf. Figures 1 et 1bis représentant le schéma général de la méthode d'isolement du promoteur).

L'analyse a montré qu'il correspondait à un gène codant pour une PR protéine de classe 10 selon la

classification de VAN LOON (1994). C'est pourquoi ce gène a été dénommé Ms PR10-1 (*Medicago sativa* PR protéine classe 10, clone 1). L'ADNc PR7 isolé et cloné a permis d'obtenir deux sondes grâce à la présence d'un site *Bam* *HI* interne (B sur la Figure 1). Celles-ci, EB et BE (E correspondant au site *Eco* *RI* sur la Figure 1) nommées respectivement 5' et 3', ont été utilisées pour cribler une banque génomique de luzerne. Parmi les clones obtenus, reconnus par les sondes 5' et 3', l'un d'entre eux, C15, a été sélectionné et séquencé (6,1 kb). Il possède lui aussi comme il est logique un site *Bam* *HI* qui a permis d'obtenir deux nouveaux fragments EB de 2,4 kb et BE de 3,7 kb nommés respectivement E-B(g) et B-E(g), g indiquant la nature génomique des fragments obtenus (voir Figure 1bis). Le fragment E-B(g), situé en 5' du clone C15, comprenant le promoteur et une partie de sa séquence codante du gène Ms PR10-1 a été inséré dans les sites *Eco* *RI* et *Bam* *HI* du plasmide bluescript. Le plasmide a été linéarisé grâce à un site *Pst* *I*, situé en amont de *Bam* *HI* dans le fragment E-B(g). Sur ce fragment, une délétion de 3' en 5' a été réalisée jusqu'à obtenir la séquence promotrice IND S1 (Figure 3). Une ligation en bout franc a permis de repositionner un autre site *Bam* *HI*, interne au clone C15, à la fin de la séquence promotrice du gène Ms PR10-1. Dans ces conditions, 13 nucléotides de la séquence codante du gène Ms PR10-1, situés en amont de ce site *Bam* *HI* interne du clone C15, ont été ainsi intégrés à la séquence promotrice IND S1, l'ensemble peut être isolé par une digestion *Eco* *RI* / *Bam* *HI* (voir Exemple 1).

Dans la description, on entend également par PMS PR10-1 tout fragment d'acide nucléique de la séquence IND S1 à effet de promoteur chez les plantes et la séquence IND S1 avec 13 nucléotides de la séquence codante du gène Ms PR10-1 telle que décrite ci-dessous.

L'invention concerne également des acides nucléiques selon l'invention, caractérisés en ce que la

séquence d'un gène codant pour une stilbène synthase, qu'il soit homologue ou hétérologue, est choisie parmi les gènes isolés à partir des génomes de l'arachide, de l'orchidée, de la vigne et du pin (EP-309 862, EP-464 461).

5 Parmi lesdits acides nucléiques, on préfère les acides nucléiques codant pour une stilbène synthase de vigne, notamment celles décrites dans l'article de HAIN, R. et al., Nature 1993, 361, 153-156 et dans celui de WIESE, W. et al., Plant Mol. Biol., 1994, 26, 2, 667-677, l'acide
10 nucléique correspondant à la séquence *vst1* desdits articles est le plus préféré.

 Les acides nucléiques permettant l'expression du ou des gène(s) de stilbène synthase pourront bien entendu comporter, outre ledit ou lesdits gène(s), des séquences
15 notamment de polyadénylation à l'extrémité 3' du brin codant, ainsi que des séquences « enhancer » dudit gène ou d'un gène différent.

 Bien entendu, les séquences des acides nucléiques devront être adaptées afin de s'assurer que le gène sera
20 effectivement lu en phase de lecture correcte avec le promoteur et il sera évidemment possible de prévoir d'utiliser, si cela est nécessaire, plusieurs promoteurs du même type ainsi que plusieurs séquences « enhancer ».

 Il est également possible d'exprimer à l'aide des
25 acides nucléiques selon la présente invention plusieurs gènes de stilbène synthase, soit placés en cascade, soit portés par des systèmes d'expression différents.

 Les acides nucléiques selon l'invention peuvent être utilisés pour la réalisation de systèmes d'expression
30 dans les plantes, systèmes pouvant être inductibles et/ou constitutifs suivant les tissus ou organes de la plante transformés (cf. Exemples 2, 3 et 4).

 La présente invention a donc également pour objet des systèmes d'expression d'au moins un gène de stilbène
35 synthase chez les plantes, caractérisés en ce qu'ils comportent au moins un acide nucléique selon l'invention. Parmi les systèmes selon l'invention, on préfère les

vecteurs de transformation et notamment les vecteurs de transformation de type plasmidique. Avantageusement, lesdits vecteurs de transformation sont caractérisés en ce qu'ils peuvent être transférés dans des souches d'*Agrobacterium*.

Les gènes de stilbène synthase pouvant être exprimés par les acides nucléiques selon la présente invention sont placés sous le contrôle du promoteur PMS PR10-1 afin de déclencher chez les plantes des mécanismes de résistance aux pathogènes qui sont sensibles aux stilbènes, notamment au resvératrol, à la pinosylvine ou à leurs dérivés glycosylés comme le picéide ou à des oligomères comme les viniférines. Parmi ces parasites sensibles aux stilbènes, on peut citer *Botrytis cinerea*, *Plasmopora viticola*, *Eutypa lata*, etc..

Parmi les systèmes d'expression selon l'invention, on préfère ceux caractérisés en ce qu'ils sont inductibles dans les plantes par un stress biotique ou abiotique.

Parmi lesdits stress biotiques selon l'invention, on préfère en particulier les stress biotiques engendrés par l'attaque d'un parasite sensible aux stilbènes tel qu'un virus, une bactérie, une levure, un champignon, notamment *Botrytis cinerea* ou *Plasmopora viticola*.

Parmi lesdits stress abiotiques selon l'invention, on préfère en particulier les stress abiotiques engendrés par une blessure mécanique, telle que celle causée notamment par un insecte ou par un phénomène physique tel que le vent ou le gel.

La présente invention a également pour objet des cellules végétales transformées par un système ou un vecteur selon l'invention. Avantageusement, lesdites cellules végétales sont des cellules de vigne.

La présente invention concerne également des procédés permettant de transformer des cellules végétales à l'aide d'un procédé microbiologique incluant les systèmes ou les vecteurs selon la présente invention.

L'invention concerne en outre des procédés d'obtention de plantes exprimant un (ou plusieurs) gène(s) de stilbène synthase, caractérisés en ce qu'on transforme des cellules végétales desdites plantes à l'aide d'un système ou d'un vecteur selon l'invention, on sélectionne les cellules exprimant ledit ou lesdits gène(s) et l'on régénère une plante à partir de ces cellules.

Parmi les méthodes de transformation les plus utilisées, il faut citer notamment les méthodes mettant en oeuvre *Agrobacterium*, qu'il s'agisse d'*Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*, de biolistique ou toutes autres techniques (électroporation, etc.).

Ces méthodes sont connues (REAM, W., 1989 ; NEGRETIU, I. et GHARTI-CHHETRI, G.B., 1991 ; CASSE-DELBART, F., 1996 ; STANFORD, J.C., 1990) et elles ne seront pas décrites de nouveau en détail.

La technologie, partant notamment de systèmes plasmidiques, permet d'effectuer une première transformation d'une souche de bactéries compétentes, en général *E. coli*, ce qui permet de cloner et de contrôler la structure des plasmides. La souche est ensuite utilisée pour transférer les plasmides recombinants dans des souches d'agrobactéries qui seront ensuite utilisées pour transformer les cellules végétales.

Les plantes comportant un système d'expression ou des cellules selon l'invention font partie de l'invention.

Font également partie de l'invention, les plantes obtenues par la mise en oeuvre des procédés selon l'invention.

Enfin, l'invention concerne les plantes selon l'invention, caractérisées en ce qu'il s'agit de plantes d'intérêt agronomique, notamment la vigne.

D'autres caractéristiques et avantages des constructions et des procédés selon la présente invention pourront être mis en évidence dans les exemples qui vont suivre.

Légendes des Figures

Figures 1 et 1 bis : Schéma général représentant les différentes étapes de la méthode d'isolement du promoteur inductible PMS PR10-1 correspondant à la séquence IND S1.

Figure 2 : Présentation des divers clones isolés et correspondant au Southern blot, hybridé avec les parties 5' et 3' de l'ADNc-PR7, délimitées par un site *Bam HI* (B) interne, détecté dans cet ADNc.

Sites de restriction : E = *Eco RI*, B = *Bam HI*.

Les valeurs indiquées sur la figure sont exprimées en kb (kilo bases).

Figure 3 : Séquence d'ADN correspondant à la séquence IND S1, séquence génomique isolée du promoteur inductible de luzerne PMS PR10-1.

Figure 4 : Séquence d'ADN correspondant à la séquence d'un gène de stilbène synthase de vigne modifiée par l'ajout d'un adaptateur (*vst1* modifié).

La partie modifiée est représentée en caractère italique.

Les parties codantes et non codantes (intron) sont représentées respectivement en lettres majuscules et minuscules.

Figure 5 : Séquence d'ADN comprenant la séquence du promoteur inductible PMS PR10-1 (correspondant à la séquence IND S1 en minuscule) associée à la séquence d'un gène de stilbène synthase de vigne modifiée par l'ajout d'un adaptateur (*vst1* modifié, correspondant à la Figure 4). Entre les deux (encadré dans la séquence) se trouvent (écrits en minuscule, fin du promoteur et en majuscule, début du gène contenant le codon d'initiation de la traduction) les 13 nucléotides venant d'une séquence interne de la phase codante du gène Ms PR10-1, l'ATG ayant été mis en phase de lecture avec le gène *vst1* modifié, ces nucléotides sont donc intégrés à la phase codante de *vst1*.

La séquence du promoteur inductible PMS PR10-1 inclut les 7 des 13 nucléotides de la séquence du gène Ms PR10-1 (en minuscule dans l'encadré).

Les parties codantes et non codantes (intron) de la
5 partie correspondant à la séquence du gène de stilbène
synthase de vigne sont représentées respectivement en
lettres majuscules et minuscules.

Figure 6 : Mise en évidence de l'induction de gène codant
pour une stilbène synthase par les U.V..

10 Les ARNs sont extraits d'environ 1 g de feuilles
17 heures après induction aux U.V.. 10 à 20 µg sont déposés
sur gel dénaturant formaldéhyde-formamide. Après migration
(3 V.cm⁻¹), les ARNs sont transférés sur membrane nylon et
fixés par exposition aux U.V. (254 nm, 33 mJ.cm⁻²). Le
15 Northern blot est obtenu par hybridation à 65°C pendant une
nuit avec la sonde *vst1* biotinylée.

L'explant de départ est constitué de feuilles isolées
de vitroplants de 41B (témoin) ou de 41B transformés
génétiqument avec une construction (insert 13 kb,
20 comprenant deux gènes de stilbène synthase complets *vst1*,
vst2, un morceau d'ADN génomique de vigne et un autre gène
de stilbène synthase de vigne (*vst3*) tronqué) intégrant des
copies surnuméraires de gènes codant pour des stilbènes
synthases de vigne sous contrôle de leurs propres
25 promoteurs (clones 2 et 3 correspondant respectivement aux
clones 55-2 et 55-3). 41B : porte-greffe hybride *V.*
vinifera, Chasselas x *V. berlandieri*.

Figure 7 : Cinétique d'accumulation des ARNs de stilbène
synthase après induction aux U.V..

30 Les ARNs sont extraits d'environ 1 g de feuilles. 10 à
20 µg sont déposés sur gel dénaturant formaldéhyde-
formamide. Après migration (3 V.cm⁻¹), les ARNs sont
transférés sur membrane nylon et fixés par exposition aux
U.V. (254 nm, 33 mJ.cm⁻²). Le Northern blot est obtenu par
35 hybridation à 65°C pendant une nuit avec la sonde *vst1*
biotinylée.

Les explants sont des feuilles isolées de vitroplants de 41B. Le témoin est un clone non transformé génétiquement contrairement aux clones 2 et 3 (correspondant respectivement aux clones 55-2 et 55-3) qui ont intégré dans leur génome l'insert 13 kb (voir ci-dessus) contenant des gènes codant pour des stilbènes synthases de vigne (vst1 + vst2). 41B : porte-greffe hybride *V. vinifera*, Chasselas x *V. berlandieri*.

Figure 8 : Quantités de resvératrol présentes dans les feuilles de vitroplants, traitées 8 min aux U.V. et analysées à différentes périodes après induction.

Les quantités sont exprimées en μg par g de matière fraîche.

NI : non induit.

Le témoin est constitué par des feuilles prélevées sur 41B non transformé. PCT 55-2 et 55-3 représentent deux transformants ayant intégré l'insert de 13 kb comprenant deux gènes de stilbène synthase complets (vst1 et vst2).

Figure 9 : Inhibition de croissance du mycélium de *Botrytis cinerea*, souche 916T, après 7 jours à 20°C.

La culture du mycélium est réalisée sur milieu malt-glucose contenant les différentes concentrations de resvératrol.

Figure 10 : Planche photo 1

Observations macroscopiques caractéristiques des différentes variétés de vigne en interaction avec *Botrytis cinerea* 5 jours après inoculation des feuilles de vitroplants par une suspension de conidies - Plantes non transformées.

En haut :

- Gauche : Cépage Folle blanche, clone 280 sensible.
- Droite : Cépage Pinot noir, clone 386 moyennement tolérant.

En bas :

- Gauche : Cépage Ugni-blanc, clone 479 tolérant.
- Droite : Porte-greffe 41B tolérant.

Figure 11 : Planche photo 2

Observations macroscopiques caractéristiques de clones de porte-greffe 41B, transformés par différentes constructions (145 : Promoteur PMs PR10-1 - gène *vst1* ; 55 : insert de 13 kb comprenant deux gènes *vst1* et *vst2* sous contrôle de leurs propres promoteurs), en interaction avec *Botrytis cinerea*, 5 jours après inoculation de feuilles de vitroplants par une suspension de conidies.

En haut :

- 10 - Gauche : Clone 145-2.
- Droite : Clone 145-5.

En bas :

- Gauche : Clone 145-6.
- Droite : Clone 55-3.

15 Figure 12 : Planche photo 3

Observations caractéristiques, en microscopie à fluorescence, de différentes variétés de vigne en interaction avec *Botrytis cinerea*, 5 jours après inoculation de feuilles de vitroplants par une suspension de conidies.

- 20 Fluorescence : bloc de filtres A (excitation de 340 à 380 nm ; filtre d'arrêt à 425 nm). Le resvératrol émet une lumière de fluorescence en blanc bleuté et bleu (selon sa concentration), la chlorophylle en rouge. La zone noire
- 25 correspond à la zone d'infection par le champignon ou à des zones nécrotiques lorsqu'elles sont petites.

En haut :

- Gauche : Cépage Folle blanche, clone 280 sensible, peu ou pas de synthèse de resvératrol.
- 30 - Droite : Cépage Pinot noir, clone 386 moyennement tolérant. Synthèse de resvératrol dans les nervures et dans la zone de macération du champignon.

En bas :

- 35 - Gauche : Porte-greffe 41B (tolérant) non transformé. Synthèse de resvératrol intense dans les nervures et dans le limbe autour des zones d'infection petites et très localisées (zones nécrotiques).

- Droite : Porte-greffe 41B transformé par la construction 145, c'est-à-dire le promoteur PMs PR10-1 gène *vst1*, clone 145-5 très tolérant. Forte synthèse de resvératrol autour et, dans la zone d'infection, dans les nervures et sur la presque totalité du limbe de la feuille.

Exemple 1

Obtention de clones génomiques comprenant des séquences régulatrices de gènes PR protéine de luzerne

10

A) Obtention d'une sonde pour la recherche des promoteurs (cf. Figures 1 et 1 bis)

15

20

La réponse incompatible (réaction d'hyper-sensibilité HR), obtenue dans la relation hôte-parasite luzerne (*Medicago sativa*) et *Pseudomonas syringae* pv *pisi* a permis de constituer une banque d'ADNc. Elle a été réalisée à partir d'ARNs messagers extraits et purifiés de la zone voisine de la nécrose provoquée par l'infection bactérienne. Les prélèvements de matériel végétal ont été effectués 6 heures après l'infiltration par la suspension bactérienne.

25

30

35

Chez les légumineuses, les PR protéines sont connues pour avoir des motifs conservés, ceci a permis la synthèse d'oligonucléotides correspondant à ces motifs définis à partir des séquençages déjà réalisés sur PR protéines de pois et de soja. Une amplification par PCR a permis d'obtenir une sonde radioactive, utilisée ensuite pour sélectionner dans la banque d'ADNc des transcrits. Parmi ceux-ci, un des clones : ADNc-PR7 a été retenu car après séquençage il a présenté 87 % d'homologie avec les gènes codants pour les PR protéines de pois et de soja. L'analyse a montré qu'il correspondait en fait à un gène codant pour une PR protéine de classe 10 selon la classification de VAN LOON et al. (1994). Il a été nommé Ms PR10-1 (*Medicago sativa* PR protéine classe 10, clone 1).

Un contrôle, effectué chez la luzerne par Northern blot, a montré que le transcrit correspondant

s'accumulait dès 3 heures après l'infection dans le cas de la réaction incompatible, passait par un maximum entre 24 et 48 heures et diminuait lentement à partir de 72 heures.

Ce fragment est caractérisé par l'existence d'un site *Bam* HI interne (noté B sur la figure 1) qui délimite deux parties :

- l'une dite 5', d'environ 340 bases, inclut la région amont de l'ATG (qui est transcrite mais non traduite) et une séquence aval correspondant à 306 bases,

- l'autre dite 3', correspond à la fin de la partie codante soit 165 bases et à la région 3' non traduite soit 186 nucléotides du codon stop jusqu'au début du poly A.

B) Isolement de clones génomiques comprenant des promoteurs de PR protéines

1) Isolement de clones génomiques

Une banque génomique de luzerne, préparée dans EMBL4 (titre : 7.10^8 p.f.u. (plate forming units) . ml⁻¹), a été utilisée à cette occasion et 6.10^5 p.f.u. étalées.

Pour cribler cette banque, le fragment 5' de Ms PR10-1 (ADNc-PR7) a servi de sonde et 45 clones ont donné un signal, intense sur 13 d'entre eux. Les cartes de restriction et les hybridations, réalisées avec les fragments 5' et 3' de Ms PR10-1, ont permis de conclure à l'existence de 7 clones distincts (cf. Figure 2). La comparaison des tailles des 7 clones (9,3 ; 6,5 ; 6,1 ; 5,8 ; 4,8 ; 4,2 ; 2,2 kb) obtenus à partir du criblage de la banque, à celle des bandes détectées sur blot d'ADN génomique de luzerne a montré une bonne concordance entre ces deux types de données expérimentales (cf. Figure 2). Il a donc été possible d'en déduire que les gènes codant pour la protéine PR7 correspondaient à une petite famille multigénique.

Les fragments (sites *Eco*RI/*Eco*RI) de ces clones (hormis le clone C12) ont ensuite été sous clonés en totalité ou en partie et les séquençages entrepris.

2) Séquençages réalisés

Un clone a été choisi pour être séquençé en premier, le clone C15 (cf. Figure 1 bis).

Les premiers travaux de séquençage ont mis en évidence la présence d'un intron d'environ 315 nucléotides dans le cadre ouvert de lecture du gène codant pour la PR protéine. Le clone étudié a été analysé ensuite après digestion par *Bam HI* (cf. Figure 1bis).

Clone C15 : 6,1 kb

L'analyse du clone par *Eco RI* et *Bam HI* a permis d'obtenir deux fragments E-B (environ 2,4 kb) et B-E (environ 3,7 kb). Après séquençage et comparaison de la séquence codante (interrompue par un intron de 600 nucléotides) avec celle du Ms PR10-1 (ADNc-PR7), il est apparu que ce clone génomique était absolument identique à cet ADNc de référence.

3) Analyse de l'expression des clones isolés dans le système luzerne-*Pseudomonas*

Les expériences ont porté sur le clone C15, en utilisant la technique d'extension en 5', pour déterminer les messagers effectivement transcrits lors de l'induction des réactions de défense. Cette technique a en outre l'avantage de permettre de localiser le site d'initiation de la transcription. Les résultats ont montré que le clone C15 était effectivement exprimé lors de l'induction des réactions de défense dans les feuilles, lors de l'interaction luzerne-*Pseudomonas*.

Exemple 2

Transformations génétiques réalisées pour vérifier l'activité promotrice du clone isolé

A) Régions promotrices utilisées

Pour ces transformations de contrôle, deux promoteurs ont été retenus : un promoteur témoin et le promoteur PR isolé du génome de la luzerne, issu de C15 (correspondant au promoteur PMS PR10-1).

1) Promoteur CaMV-35S

Ce promoteur, dit constitutif, est classiquement utilisé. Il correspond à la séquence de régulation de la transcription du gène de la sous unité ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV). La région promotrice qui a été utilisée pour réaliser la construction avec le gène rapporteur *gus*, correspond en fait à une fraction de ce promoteur, isolée de nouveau sous forme d'un fragment *EcoRI/BamHI* à partir du plasmide pDH51 (PIETRZAK et al., 1986).

2) Promoteur PR

La région promotrice du clone génomique C15 a été étudiée. Ce promoteur a été appelé par la suite PMS PR10-1. PMS PR10-1 :

Il provient du fragment *EcoRI/BamHI* (E/B) de 2,4 kb du clone C15 (Figure 1bis). L'intégration de ce fragment dans le plasmide binaire, en amont du gène rapporteur (voir ci-après), a été rendue délicate car aucun site de restriction n'existait sur le clone C15 entre la boîte TATA (initiation de la transcription) et l'ATG (initiation de la traduction). Des expériences de délétion ont donc été réalisées jusqu'à obtenir un fragment de 1,5 kb environ (séquence IND S1). Puis, par ligation en bout franc, un autre site *Bam HI* a été ajouté au fragment ainsi obtenu pour permettre son insertion en amont des différentes séquences codantes utilisées par la suite. Ce fragment comprend donc en se référant à l'ADNc qui a servi à le cloner et outre la région promotrice amont : 39 nucléotides terminaux de la 5'UTR (UnTranslated Region) du gène Ms PR 10-1, située à 10 bp du codon ATG initiateur, l'ATG du gène Ms PR10-1 et un court fragment de sa région codante (10 bp), juste en amont du site *Bam HI* intégré. Tenant compte des sites de clonage, le promoteur ainsi construit présente un ATG potentiel ce qui pourrait conduire à la présence de deux codons ATG, à faible distance l'un de l'autre, lors des constructions de gènes chimériques. Un risque de modification de la phase codante

du gène utilisé (gène rapporteur ou gène de stilbène synthase) pourrait alors exister.

Pour les expériences de transformation avec le gène rapporteur, PMS-PR10-1 (PRI) a été utilisé tel quel après clonage dans le plasmide pSK+/- Bluescript de STRATAGENE. Il a pu être de nouveau isolé sous la forme d'un fragment *EcoRI/BamHI* de 1,5 kb environ.

3) Plasmides utilisés

a) p35S - gus intron (VANCANNEYT et al. 1990)

Ce plasmide est un dérivé de pBin19 (BEVAN, 1984) et possède comme tel les bordures droite et gauche des plasmides binaires permettant l'insertion de la partie comprise entre ces bordures dans les plantes via agrobactéries.

Le développement du gène rapporteur gus intron (intron dérivé du gène *LSI* de la pomme de terre) a permis d'éliminer les faux positifs (notamment en expression transitoire) dus aux agrobactéries contaminantes. Elles sont incapables d'épisser les introns.

Classiquement ce gène, codant pour une β -glucuronidase, permet, en utilisant un substrat particulier (le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β glucuronide), d'obtenir une coloration bleue. Celle-ci indique alors la nature transformée de la plante analysée et par voie de conséquence la transcription de la séquence codante du gène correspondant à l'enzyme, donc l'induction du promoteur qui la commande.

b) pPR97

Ce plasmide a été construit par l'un des laboratoires participant au projet pour tester l'efficacité de promoteurs (P. RATET, ISV, cité dans SZABADOS et al., 1995). Il a notamment l'avantage de posséder un site de clonage multiple, permettant une fusion transcriptionnelle avec la phase codante du gène gus (*uid A* d'*E. coli*) contenant l'intron *LSI*. Il possède en outre certaines des caractéristiques du plasmide précédent p35S - gus intron

(bordures d'intégration dans le génome des plantes, gène de sélection permettant la résistance aux antibiotiques de type néomycine : *npt II* gène).

5 L'activité du promoteur peut être révélée et mesurée par des tests histochimique et enzymatique de type GUS.

4) Dérivés de pPR97

Deux constructions principales ont été faites et utilisées par la suite pour la transformation de plantes
10 modèles.

a) pPR97 - 35S

Le promoteur 35S, cloné dans le plasmide pDH51 (cf. paragraphe 5 ci-dessous), a été extrait et inséré dans le site de clonage multiple de pPR97, en amont du gène
15 rapporteur, sous forme d'un fragment *EcoRI/BamHI*. Ce plasmide est à la fois un contrôle positif, pour démontrer que la construction est fonctionnelle, et une référence car le promoteur 35S a été placé dans le même environnement que le promoteur isolé des clones de PR protéine.

20 b) pPR97-PMS PR10-1

Les 1,5 kb ont été insérées dans le même site de clonage que celui défini ci-dessus, sous la forme là aussi d'un fragment *EcoRI/BamHI*.

c) pG3-3

25 Il a permis de réaliser un contrôle positif fort pour les tests histochimique et enzymatique en clonant deux promoteurs 35S en tandem inversé. Les séquences activatrices des promoteurs agissent alors en synergie. La phase codante du gène *gus* intron a été alors placée sous le
30 contrôle de l'un des deux promoteurs 35S.

5) Les souches d'agrobactéries réalisées

Les différents plasmides ont été utilisés pour transformer des bactéries compétentes *E. coli* souche DH5α par choc thermique en milieu chlorure de calcium. Après
35 sélection des bactéries transformées sur milieu antibiotique (Kanamycine) et contrôle par miniprep de leur

nature recombinante, elles ont servi à transférer les plasmides recombinants dans des souches d'agrobactéries par conjugaison triparentale, en utilisant la souche d'*E. coli* HB101 contenant le plasmide pRK2013 autotransférable (DITTA et al., 1985).

Deux souches d'agrobactéries ont été retenues : EHA 105, *Agrobacterium tumefaciens* désarmée, permettant la régénération de plantes transformées (transformations stables), et A4TC24, *Agrobacterium rhizogenes* utilisée pour obtenir la réaction de type chevelu racinaire (Hairy root) et des plantes composites, possédant des racines transformées mais dont le reste de la plante est de phénotype identique à celui d'origine.

6) Transformations génétiques sur plantes modèles

Deux types de transformations (transitoires et stables) ont été réalisés en utilisant trois plantes modèles *Nicotiana benthamiana*, *Medicago truncatula* et *Lotus corniculatus*.

On exposera principalement les résultats obtenus avec *N. benthamiana*.

7) Transformations transitoires

Cette première série d'expérience a été réalisée pour permettre une vérification rapide de la fonctionnalité des constructions réalisées avec le gène *gus* dans les cellules d'eucaryotes.

Des feuilles de *N. benthamiana* ont donc été excisées et mises en coculture sur milieu gélosé avec les différents dérivés de la souche EHA 105. Des tests histochimiques ont été ensuite pratiqués 48 h après la transformation puis examinés après une nuit d'incubation (12 h).

Les plasmides de contrôle p35S-*gus* intron et pPR97-35S ont donné une coloration GUS positive bien que faible avec le second plasmide.

Cette faible réactivité vient sans doute d'un problème de construction car à proximité du site

d'initiation de la transcription et de l'ATG du gène *gus* une partie du polylinker a dû être gardée. Celle-ci comportant une séquence répétée peut gêner la transcription du gène.

5 La construction pPR97-PMS PR10-1 a montré une activité du gène *gus* semblable à celle du contrôle positif 35S-*gus* intron. Ce promoteur que l'on attendait inductible, a donc présenté un effet comparable à un promoteur constitutif.

10 Ce résultat peut être expliqué comme la conséquence soit de l'infection bactérienne soit des blessures effectuées sur les feuilles lors du prélèvement ou de la mise en culture. La première hypothèse ne pouvant être vérifiée, le protocole expérimental a été modifié pour
15 diminuer le stress causé aux explants (élévation de l'osmolarité du milieu de coculture en utilisant des concentrations de saccharose de 10 à 30 g.l⁻¹, réalisation d'une gamme de vide plus ou moins poussée : de 10 à 80 mm de mercure de vide relatif et création de lésions plus ou
20 moins fortes sur les feuilles avec écrasement important ou moyen de l'épiderme).

Les résultats ont montré que plus la pression était importante, plus le nombre de cellules transformées était élevé. Cependant, un compromis doit être trouvé pour
25 obtenir des transformations stables car les nombreuses transformations transitoires, obtenues dans ce cas, se révèlent par la suite souvent létales pour les cellules. Elles sont alors incapables de donner des cals et donc de régénérer des bourgeons puis des plantes. Par ailleurs, la
30 nature inductible du promoteur est en partie confirmée car si la coloration due à la construction 35S-*gus* intron est détectable jusqu'à 5 jours après la coculture, celle obtenue avec pPR97 - PMS PR10-1-*gus* intron apparaît plus rapidement à 48 heures mais décroît ensuite très vite.

35 8) Transformations stables
 a) Tabac : *N. benthamiana*

Une série de transformations a été réalisée avec pPR97-35S, pPR97-PMs PR10-1 et pG3-3. Un nombre important de plantules a été obtenu pour cette série de transformations. Pour chacun des plasmides utilisés, on a
 5 cherché à obtenir au moins 7 plantes acclimatées. Cependant, cela n'a pas été possible pour p35S-gus intron où seulement 5 plantes ont été régénérées et acclimatées. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau 1.

10 Tableau 1 : Transformations stables obtenues sur *N. benthamiana* par transformation avec la souche EHA 105 d'*Agrobacterium tumefaciens* et ses dérivés.

Constructions	Cals/explants mis en culture	Bourgeons obtenus	Plantules	
			In vivo Accl.	
p35S-gus intron	10 (45)	6 (1)	5	5
pPR97-35S gus intron	115/122	23	13	12
pPR97-PMs PR10-1 gus intron	135/139	27	20	7
pG3-3-35S en tandem inversé (promot. Fort)	non évalué	37	28	20

15 Légende du tableau 1 :

Les résultats sont exprimés en quantité obtenue.

Accl. : plantules acclimatées.

Nombre de bourgeons par explants : le chiffre entre
 20 parenthèses correspond au nombre de bourgeons obtenus à un mois, pour la première série. Pour celle-ci (comportant la construction 35S gus intron), les cals ont été laissés plus

longtemps sur le milieu de culture afin d'obtenir un maximum de bourgeons et donc de plantes à acclimater. Pour la seconde série, après un mois, un nombre suffisant de bourgeons a été obtenu et l'expérience a alors été arrêtée.

5 Les transformations génétiques : elles sont faites classiquement sur des morceaux de limbe de feuilles de 1 cm^2 , immergés 30 secondes dans la suspension d'*Agrobacterium* puis, cocultivés 48 heures avant repiquage sur milieu gélosé de division cellulaire et de caulogénèse
10 (MURASHIGE et al., 1962), ANA (acide naphtalène acétique) $0,1\text{ mg.l}^{-1}$, BAP (benzyl amino purine) 1 mg.l^{-1} , cefotaxime 400 mg.l^{-1} (élimination des agrobactéries) et kanamycine 70 mg.l^{-1} (agent de sélection des cellules transformées).
15 Dès l'apparition des premiers bourgeons (environ un mois après coculture), ils sont placés sur milieu d'enracinement identique au premier mais ne comprenant pas d'hormones végétales.

L'analyse rapide des résultats, en fonction de l'expression du gène *gus* intron selon la nature du
20 promoteur situé en amont de la phase codante du gène, montre que le promoteur PMS PR10-1 donne les meilleurs résultats de l'ensemble des promoteurs testés. Une analyse plus détaillée est présentée ci-après.

9) Caractéristiques du promoteur PMS PR10-1

25 Plasmide pPR97-PMS PR10-1-*gus* intron

Ce promoteur a donné les meilleurs résultats avec des différences d'expression constitutive du gène *gus* selon les organes testés.

a) Activité dans les cals

30 Une expression constitutive forte a été trouvée. Quelques minutes d'incubation ont suffi pour obtenir un test histochimique positif. Le promoteur est donc fortement induit dans ce type de matériel, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par VAN LOON (1985). Les cals en
35 culture in vitro sont en état de stress et dans ces conditions les PR protéines sont exprimées.

b) Activité sur plantes entières acclimatées

Racines

Le promoteur est induit et le test histochimique est positif après 2 heures d'incubation (contre 5 heures avec le promoteur 35S). L'activité du gène *gus* n'est pas uniforme dans les racines de tabac, seuls l'épiderme des parties âgées et le méristème apical ont donné la coloration bleue caractéristique du test. Selon la littérature une activité des gènes de défense dans les racines est aussi classiquement observée.

Fleurs

Chez tous les tabacs transformés par cette construction, une forte activité constitutive a été trouvée dans les fleurs et plus particulièrement dans les anthères et le pollen. Une activité du gène *gus* a aussi été décelée dans les trichomes des sépales et plus faiblement dans les pétales. Ces résultats sont aussi en accord avec ceux de VAN LOON (1985) qui indiquent une induction des gènes de défense dans les pièces florales.

Feuilles

Une faible activité constitutive *gus* a été observée dans les trichomes de jeunes feuilles de plantes adultes. Chez le tabac, le stade rosette à larges feuilles correspond au stade juvénile et le stade vieillissant à celui de la formation des graines. Cette faible activité a été constatée majoritairement dans les trichomes pluricellulaires. L'expression d'une protéine PR dans de telles structures n'a jamais été décrite à notre connaissance.

Une activité inductrice constitutive du promoteur isolé PMs PR10-1 est donc possible dans les trichomes des feuilles de tabac (3 plantes sur 7) mais elle semble sous l'influence des stades de développement.

En l'absence d'induction par un pathogène, l'activité du promoteur chez le tabac est donc limitée à la racine, aux pièces florales (anthères et pollen) et à quelques cellules de la partie aérienne (trichomes essentiellement).

Exemple 3Autres espèces végétales transformées1) *Medicago truncatula*

5 Pour cette espèce, on a cherché à réaliser des plantes composites, c'est-à-dire possédant à la fois une partie aérienne de type sauvage (non transformée génétiquement) et des racines transformées.

De jeunes germinations ont été utilisées. Après développement de la racine principale, les hypocotyles excisés, ont été trempés dans une suspension d'*Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 possédant soit le plasmide p35S-gus intron soit le plasmide pPR97-PMS PR10-1-gus intron, de façon à obtenir par la suite des racines néoformées transformées. Après une semaine, des racines ont été obtenues et un test histochimique GUS a été réalisé. Pour cette expérimentation, le témoin a été constitué par de jeunes germinations traitées de manière identique aux lots précédents (hypocotyles excisés mais non trempés dans la suspension d'agrobactéries).

20 Tous les explants du lot témoin ont néoformé des racines en une semaine, par contre, 50 % seulement ont réagi pour les lots traités par les agrobactéries. Quel que soit le traitement, aucune racine n'a donné de réponse positive au test GUS. En revanche, la base des hypocotyles des lots traités, bien que nécrosée, a souvent réagi pour donner une coloration bleue (présence de cellules transformées). La partie nécrosée des explants a alors été excisée et ils ont été remis en enracinement. 50 % ont alors développé des racines néoformées dont certaines se sont révélées, dans quelques zones, positives au test.

35 Ce sont donc des racines chimériques (cellules transformées et non transformées) qui ont été obtenues, les parties transformées correspondant à des lignées cellulaires ayant intégré la construction dans une cellule souche de base.

Les deux constructions testées, p35S-gus intron et pPR97-PMs PR10-1-gus intron, ont donné ces lignées cellulaires racinaires transformées dans respectivement 3 et 2 explants sur les 6 mis en expérimentation pour chaque lot.

Bien que le modèle expérimental ne soit pas adapté à l'étude poursuivie (étude de l'expression des protéines PR lors du phénomène de nodulation par *Rhizobium*), il n'en a pas moins démontré que le promoteur PMs PR10-1 est tout aussi fonctionnel dans cette plante que dans la plante d'origine (*Medicago sativa*).

2) *Lotus corniculatus*

L'expérimentation avait, là aussi, pour but d'étudier l'induction du promoteur lors de la nodulation par la bactérie symbiote *Rhizobium meliloti* NZP 2037 (PETIT et al., 1987). Des plantes composites ont donc été réalisées en transformant des cellules de l'hypocotyle de jeunes germinations de Lotier par *Agrobacterium rhizogenes* souche A4TC24, pour obtenir le phénomène de chevelu racinaire (phénotype hairy root). Une fois celui-ci développé, les racines principales ont été excisées et les plantules ont été placées en milieu liquide pour accroître le développement du phénomène. Une fois les plantes acclimatées, l'étude de l'induction des promoteurs lors de la symbiose fixatrice d'azote a été réalisée en plaçant les plantules en conditions de nodulation (BLONDON, 1964). Les deux promoteurs d'étude retenus ont été les mêmes que ceux utilisés lors de l'expérimentation menée avec *M. truncatula* : 35S et PMs PR10-1. Pour ces deux constructions, moins de 10 % des racines à phénotype hairy root ont montré des racines positives au test GUS. D'une manière générale, les racines ayant ce phénotype ont donné moins de nodules que les racines témoins.

Pour celles obtenues avec la construction comportant le promoteur 35S, seuls les nodules ont présenté

une réponse positive au test GUS, alors que pour l'autre (promoteur PMS PR10-1), la coloration s'est développée sur toute la racine, exceptée au point d'initiation des racines secondaires. Par ailleurs, cette dernière construction n'a pas permis d'obtenir de nodules sur les racines issues de chevelu racinaire en interaction avec *Rhizobium meliloti*.

Exemple 4

Etude de la réaction d'hypersensibilité du tabac transformé avec les constructions utilisant des promoteurs du gène PR de luzerne et le gène gus intron

A) Réaction d'hypersensibilité sur *N. benthamiana* transformé avec les constructions associant le promoteur du gène PR de luzerne et le gène gus intron

1) Test de réaction d'hypersensibilité (HR)

La réaction d'hypersensibilité (HR), développée dans l'interaction *N. benthamiana* - *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, a été utilisée dans cette étude. Des plants de tabac transformés, ayant incorporé dans leur génome les différents inserts des plasmides p35S gus intron et pPR97-PMS PR10-1-gus intron, ont été acclimatés puis infiltrés par une suspension de *P. syringae* (ESNAULT et al., 1993) à une concentration de 10^9 bactéries par ml. La solution a été injectée dans le limbe à l'aide d'une seringue hypodermique. Avec un tel modèle, en 48 heures, la réaction de type HR est considérée comme bien développée. Les feuilles, infiltrées par les suspensions de bactéries, ont été prélevées 24, 48 et 96 heures après inoculation pour évaluer, par test histochimique GUS, l'induction des différents promoteurs étudiés. L'analyse d'une éventuelle réponse systémique a été aussi évaluée, en utilisant le même test histochimique, sur des feuilles situées en dessous de la feuille infiltrée.

2) Etude de l'induction des promoteurs en conditions de réaction de type HR

a) Promoteur constitutif 35S

Dans le cas du promoteur constitutif 35S (plasmide pG3-3 par exemple), l'inoculation par *P. syringae* n'a pas modifié la réponse au test et cela en quelques minutes d'incubation. L'infiltration par les bactéries n'altère donc pas l'activité glucuronidase de type constitutif obtenue avec le promoteur 35S.

b) Promoteurs de gènes de protéines PR :
Promoteur PMS PR10-1

Comme le montre le tableau 2, ce promoteur est bien inductible par l'attaque par un pathogène. A 24 heures, la réaction de type HR n'est pas encore entièrement développée (48 heures pour l'exposition complète), cependant, le test GUS est déjà positif. Avec les jeunes plants de tabac transformés obtenus, la coloration est faible et produite majoritairement dans le limbe de la feuille infiltrée.

En réponse systémique, réponse au niveau de la feuille inférieure à la feuille infectée, la coloration est uniquement dans le limbe. Les plants de tabac adultes (tiges développées mais n'ayant pas encore fleuries) et juvéniles (en rosette) ont le même type de réponse avec une activité faible du gène *gus*, déterminée par le test histochimique.

Pour les tabacs plus âgés, en fleur ou portant des graines, la coloration obtenue lors du test est plus intense, surtout dans les nervures et les trichomes de la feuille infectée et uniquement dans ces tissus pour la réponse systémique.

Des différences d'expression du gène rapporteur sont donc mises en évidence selon l'âge de la plante. Cette réponse, dépendante du stade de développement de la plante, a été trouvée dans la plupart des études menées sur les protéines PR des végétaux. L'induction du promoteur PMS PR10-1 est un phénomène transitoire puisque l'expression du gène rapporteur n'est plus visible 96 heures après l'inoculation par les bactéries.

L'induction n'est pas non plus limitée à la réaction de type HR obtenue lors de l'interaction plante/bactérie. Le même type de réponse a été obtenu avec la construction PMS PR10-1-gus intron lors d'une infection de l'un des explants par un champignon. Une expression homogène du gène *gus* a alors été visible sur l'ensemble de la feuille infectée, hormis la zone de contamination qui, elle, s'est nécrosée.

Tableau 2 : Induction des différents promoteurs étudiés lors de la réaction de type HR entre *N. benthamiana* et *P. syringae*.

Construction	<u>24h après inoculation</u>		<u>96h après inoculat.</u>
	Feuille infiltrée	Feuille inférieure	feuille infiltrée réaction type HR
PMS PR10-1	6/7	6/7	0/3
pG3-3 (35S)	3/3	3/3	2/2

Légende du tableau 2 :

Les résultats sont présentés en nombre de plantes répondant positivement au test histochimique GUS par rapport au nombre de plantes analysées.

B) Expression quantitative du gène *gus* intron sous contrôle des différents promoteurs

La méthode est basée sur un test enzymatique. Elle utilise :

a) un extrait brut de l'enzyme codée par le gène *gus* obtenu à partir des plants de tabac transformés, et

b) un substrat, le p nitrophényl glucuronide. La vitesse d'hydrolyse du substrat est suivie au spectrophotomètre et est rapportée à la quantité totale de protéines de l'extrait. La méthode nécessite par contre la

présence d'un promoteur fort, en amont du gène *gus*, car elle est peu sensible.

En conséquence, elle n'a pas été appliquée aux essais pour lesquels 12 heures ou plus d'incubation avec le substrat, utilisé pour le test histochimique (X gluc : 5-bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl - β glucuronide), ont été nécessaires.

Dans ces conditions expérimentales, le promoteur 35S, placé dans le plasmide pG3-3, a donné une vitesse d'hydrolyse du substrat (exprimée en unité arbitraire) 5 fois plus élevée que le promoteur PMS PR10-1, placé quant à lui dans le plasmide pPR97. Par contre, le promoteur PMS PR10-1 a donné une plus forte expression du gène *gus* que le promoteur 35S, si celui-ci est placé dans le plasmide p35S-*gus* intron. En effet, dans ce dernier cas, aucune détection d'hydrolyse du substrat n'a été obtenue.

De même, les autres constructions n'ont pas permis de donner de valeurs détectables au spectrophotomètre.

Exemple 5

Isolement de l'ADN correspondant à un gène de stilbène synthase et expression de la stilbène synthase

Deux méthodes ont été utilisées pour obtenir un gène codant pour une stilbène synthase de vigne. D'une part, les données de la littérature (WIESE et al., 1994) ont permis de connaître la séquence d'un gène. D'autre part, un insert génomique de 13 kb environ a été fourni par BAYER AG (Agrochemical Division Research / Biotechnology-Pflanzenschutzzentrum, MONHEIM, D-51368 LEVERKUSSEN). Il est précisé que la société BAYER a déposé auprès du Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM), en Allemagne, des souches d'*E. coli* contenant des plasmides portant des gènes de stilbène synthase de vigne (cf. EP-464 461) : la souche *E. coli* Fier 1 pVst 1 (DSM 6002, déposée le 18 Juin 1990), la souche *E. coli* Fier 2 pVst 2 (DSM 6003, déposée

le 18 Juin 1990), et la souche *E. coli* Fier pVst 1 2 t 3 (DSM 6346, déposée le 11 Février 1991). BAYER a également déposé la souche *E. coli* Nurdug 2010 (DSM 4243, déposée le 17 Septembre 1997) qui contient le plasmide pGS 828.1 qui porte un gène de stilbène synthase d'arachide (cf. EP-309 862). L'insert utilisé pour réaliser les travaux rapportés ci-après correspond en fait à un clone génomique complexe comprenant deux séquences complètes fonctionnelles de gènes de stilbène synthase (gènes *vst1* et *vst2*) et une séquence incomplète *vst3*. Par la suite, la séquence du gène *vst1* a été sélectionnée pour être incorporée aux constructions réalisées. Elle correspond à un fragment génomique de 4,9 kb (séquence fonctionnelle dont le promoteur) qui ne possède pas de sites de restrictions adéquates pour permettre un clonage direct dans les plasmides utilisés habituellement comme vecteurs de transformation. Il a donc été ajouté des sites complémentaires par clonage intermédiaire dans un plasmide pCDNA II.

A) Ajout de sites complémentaires par clonage intermédiaire dans un plasmide pCDNA II

Le fragment génomique du gène *vst1* déjà indiqué a été isolé, du plasmide d'origine dans lequel il avait été cloné, sous forme d'un fragment *EcoRI/PstI* (2,1 kb) et cloné à nouveau dans un plasmide pUC19. Une fois cloné, le fragment *vst1* a été incorporé dans les mêmes sites (*EcoRI/PstI*) du plasmide pCDNA II pour changer les sites de restriction, supprimer le terminateur du gène et permettre l'isolement d'un insert *BamHI/BamHI* (1,8 kb). C'est ce fragment, correspondant au cadre ouvert de lecture du gène, qui a été utilisé pour faire les constructions avec les différents promoteurs dont ceux isolés de la banque génomique de luzerne (cf. Figure 4). Cet insert a par la suite été cloné dans pBIN 19 après vérification par Southern blot des tailles des différents fragments obtenus après digestion par les enzymes de restriction adéquates.

B) Etude de l'expression du gène *vst1*

Pour vérifier l'expression des gènes codant pour la stilbène synthase dans les plants de vigne, une sonde (1,8 kb), comprenant le gène *vst1*, a été préparée à partir du plasmide pCDNA II multiplié dans la bactérie *E. coli* HB 101. La sonde a été ensuite biotinylée par random priming, avec le kit Polar Plex (Plex chemiluminescent kits, Millipore), pour permettre une détection des gènes ou des transcrits codant pour une stilbène synthase par chimio-luminescence sur des Southern et Northern blots, réalisés à partir d'acides nucléiques extraits de plants de vigne témoins ou transformés.

1) Utilisation de la sonde *vst1* pour l'analyse d'ADN génomique extrait de vigne 41B (Hybride *V. vinifera* Chasselas x *V. berlandieri* ; porte greffe)

Des analyses par Southern blot ont été réalisées après extraction d'ADN génomique puis digestion de celui-ci par *EcoRI*. La sonde *vst1* a permis d'obtenir un grand nombre de bandes (environ 15). Celles-ci correspondent en fait à des fragments contenant des séquences codant pour une stilbène synthase qui constituent une famille multigénique (6 à 8 gènes selon WIESE et al., 1994). Parmi ceux-ci, *vst1*, *vst2* et *vst3* sont fortement homologues entre eux. En outre d'autres gènes peuvent être reconnus par cette sonde, notamment ceux correspondant à la famille multigénique de la chalcone synthétase. Les deux enzymes sont en effet de même structure et de même taille (dimères de sous unité de 41 à 44 kb). Elles utilisent aussi le même substrat et leur séquence d'acides aminés présente un fort taux d'homologie, au moins au niveau du site actif.

Pour vérifier si une telle hybridation croisée était possible, l'ADN de deux plasmides a été extrait. L'un, pCDNA II, contenait le gène *vst1*, et l'autre, pPCV 002, un gène de chalcone synthase de Rosier, disponible au laboratoire. Une sonde biotinylée correspondant au gène de chalcone synthase de Rosier a aussi été préparée. Les

Southern blots obtenus, en réalisant les hybridations croisées, ont montré que la sonde *vst1* reconnaissait effectivement le fragment de chalcone synthase de Rosier et inversement. Les signaux émis sont alors plus faibles dans ce cas d'hybridation croisée.

2) Dosage du resvératrol à partir de feuilles de plantes de vigne

Le matériel végétal frais, feuilles ou tiges, est réduit en poudre dans un mortier contenant de l'azote liquide et les composés apolaires sont extraits par le méthanol (1 ml pour 100 mg de matière fraîche : m.f.).

Après centrifugation pour éliminer les débris, l'extrait méthanolique est filtré sur filtre 0,45 μm puis évaporé à sec sous azote. Le résidu est repris dans le méthanol pur (100 μl / 100 mg m.f.). Afin d'éliminer les pigments (chlorophylles notamment), l'échantillon est passé ensuite sur une colonne C18 (Sep-pack WATERS), préalablement équilibrée au méthanol. L'analyse qualitative et quantitative des extraits est réalisée par C.L.H.P. (Chromatographie Liquide Haute Pression) sur une C.L.H.P. WATERS (Modèle 600 E), couplée à un détecteur à barrette de diodes (Modèle 990. WATERS). Le support de chromatographie est composé d'une colonne C18 phase inverse (ultra base C18, 205 x 4,6 mm, 5 μm ; Shandon). L'analyse des composés de l'extrait est effectuée en conditions isocratiques, la phase mobile étant constituée d'un mélange acétonitrile-eau 35/65, V/V avec un débit de 1 ml.min⁻¹.

Un spectre d'absorption est réalisé toutes les deux secondes entre 200 et 400 nm et le resvératrol est détecté à son maximum d'adsorption à 305 nm.

La quantification du resvératrol est réalisée par étalonnage externe à partir d'une droite étalon, obtenue par chromatographie de solutions à 5, 10, 20, 50 et 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, réalisées à partir de resvératrol du commerce (Sigma). La concentration en resvératrol, mesurée à partir de l'aire du pic correspondant à la molécule, est rapportée

à l'unité de masse de m. f. ou de m. s. (matière sèche) ou de masse de chlorophylle de l'échantillon dosé.

Exemple 6

5 Constructions d'acide nucléique associant le gène codant pour une stilbène synthase de vigne à différents promoteurs

1) Constructions utilisant des promoteurs constitutifs

Deux promoteurs apparentés ont été utilisés pour réaliser les constructions génétiques devant permettre une
10 expression constitutive.

Dans la première construction, l'ADN de stilbène synthase de vigne (*vst1*) a été placé sous contrôle d'une séquence de régulation constituée par une cassette contenant deux promoteurs 35S du CaMV montés en série (dans
15 la même orientation). A la fin de la séquence codante du gène *vst1* on a aussi ajouté une séquence de polyadénylation du 35S. La construction chimérique ainsi réalisée peut donc se résumer ainsi : p35S (CaMV) - p35S (CaMV) - *vst1* - poly A 35S (CaMV).

20 Dans la deuxième construction, la séquence codante *vst1* a été placée sous le contrôle de quatre séquences « enhancer » isolées du promoteur 35S du CaMV et, montées en série devant le promoteur CaMV 35S et la propre séquence « enhancer » du promoteur du gène de vigne (*vst1*).
25 Les deux séquences chimériques ainsi réalisées ont été d'abord insérées dans le plasmide PMP 90RK puis les plasmides ont été incorporés par la suite dans la souche d'agrobactéries GV3101.

Ces deux séquences de régulation sont considérées
30 comme des promoteurs constitutifs « forts ».

2) Construction homologue utilisant l'insert de 13 kb (gènes *vst* sous contrôle de leurs propres promoteurs)

Le fragment d'environ 13 kb d'ADN génomique de vigne a été décrit ci-dessus. Il comprend notamment 2 gènes
35 fonctionnels (*vst1* et *vst2*) codant pour des enzymes stilbène synthases et un gène (*vst3*) incomplet (non

fonctionnel). Cette séquence vigne a été co-intégrée à un plasmide pGV3850 qui a ensuite été introduit dans une souche d'agrobactéries. Elle correspond donc à des cadres ouverts de lecture de gènes *vst* (stilbène synthase de vigne) sous contrôle de leurs propres promoteurs.

Plusieurs séries de plantes 41B, transformées par le plasmide comportant le fragment de 13 kb, ont été obtenues et ont été étudiées et analysées par Southern blot en utilisant 3 sondes différentes (sonde de 1,8 kb du gène *nptII* ; de 2,4 kb du gène de résistance à l'ampicilline et de 1 kb de la bordure gauche du plasmide pBIN 19 comprenant la séquence de fin d'intégration du TDNA). La majorité des plantes retenues a réagi à l'une ou l'autre de ces sondes. Ces clones ont été numérotés selon un code : 55 pour la construction et 2, 3, 5, 6, 7, 9 pour les différents transformants obtenus.

3) Constructions utilisant le promoteur inductible PMS PR-10-1

La construction comprenant le promoteur PMS PR-10-1, isolé à partir des clones génomiques PR de luzerne, a été réalisée (cf. Figure 5).

Construction du plasmide pBin 19 - PMS PR-10-1 - gène *vst1* - Terminateur 35S

Le promoteur PMS PR10-1 isolé de la luzerne et le gène *vst1* comportant chacun un codon ATG initiateur de la traduction, un adaptateur a été réalisé pour cloner le gène *vst1* sans ATG supplémentaire dans la construction. Cet adaptateur a été synthétisé sous la forme de deux oligonucléotides de 11 bp chacun, l'un *Bam* *HI* compatible, l'autre *Mun* *I* compatible. L'adaptateur a ensuite été incorporé au site *Mun* *I* du gène *vst1* cloné dans le plasmide pUC19. L'insert a alors été récupéré par une digestion *Bam* *HI*, puis cloné dans pBIN 19 entre le promoteur PMS PR10-1 et le terminateur 35S. L'insertion du gène *vst1* avec son adaptateur s'est donc située entre le promoteur PMS PR10-1 et le terminateur 35S. Dans ces conditions, l'ATG du gène

vst1 a été éliminé et 3 codons supplémentaires ont été inclus dans la phase codante de vst1, en amont du gène. Il a été vérifié par séquençage que le cadre ouvert de lecture du gène se trouvait toujours en phase avec le reste de la construction.

Après transformation des plants de 41B, avec l'insert comprenant entre autre la séquence chimérique : promoteur PMS PR10-1-gène vst1 terminateur 35S, les transformants ont été analysés par Southern blot, en utilisant la sonde nptII déjà décrite. Néanmoins, l'intégration complète ne peut être démontrée pleinement par cette méthode et surtout par cette sonde, puisque dans le système d'*Agrobacterium* il est admis que l'insertion dans le génome de la plante commence à la bordure droite pour se terminer à celle de gauche. Le gène nptII étant situé, dans la construction utilisée, près de la bordure droite, une intégration partielle, gène nptII inséré mais blocage ultérieur de l'intégration avant la bordure gauche, est donc possible. Les transformants ont été codés 145 et affectés des numéros 2, 5, 6 pour ceux dont les résultats sont présentés ci-dessous.

Exemple 7

Transformation génétique de la vigne et analyse de l'efficacité des promoteurs étudiés

Comme il a été décrit ci-dessus (Exemple 6), quatre constructions principales ont été réalisées pour transformer le système modèle du laboratoire porte-greffe 41B (*V. vinifera* x *V. berlandieri*). Ce dernier a en effet l'avantage de donner de bons résultats en transformation de suspensions cellulaires embryogènes par les agrobactéries. Environ 50 transformants sont obtenus en moyenne par expérimentation en utilisant 0,1 à 1 µl de P.C.V. (Packed Cell Volume) de cellules embryogènes. De plus, la sélection, le développement des embryons transformés et la régénération en plantes sont rapides. Des plantules in

vitro, ayant 6 à 8 feuilles bien développées, peuvent être obtenues en deux mois de culture.

A) Transformation génétique du 41B avec des vecteurs ayant le gène *vst1* sous contrôle de promoteurs constitutifs

Deux constructions ont été testées, l'une comprenant le promoteur double 35S monté en série devant le gène *vst1* et la seconde, constituée par une séquence de régulation composée de 4 séquences « enhancer » 35S (CaMV) montées en série devant le promoteur 35S du CaMV, le tout situé en amont du gène *vst1* possédant sa propre séquence « enhancer ». Quatre séries d'essais ont été réalisées (deux pour chacune des constructions) afin de transformer les cellules embryogènes de vigne. Aucune n'a permis de régénérer des plantes ni même des embryons. Dans tous les cas, une nécrose rapide des suspensions cellulaires embryogènes a été obtenue après les 48 heures de coculture avec les agrobactéries. Ces constructions ne permettent donc pas d'obtenir des plantes transformées exprimant, de manière constitutive, le gène *vst1* sous contrôle de ces promoteurs « forts ». Une hypothèse peut être avancée, l'expression de ce gène pourrait bloquer la régénération en embryons par nécrose rapide des cellules à potentiel embryogène en réponse à la production de phytoalexines stilbéniques.

Ces résultats négatifs, obtenus avec les constructions comportant des promoteurs constitutifs de type 35S, démontrent l'intérêt de contrôler une sur-expression du gène *vst1* par un promoteur homologue ou hétérologue inductible notamment par un pathogène.

Ces résultats obtenus sont à rapprocher de ceux publiés par FISHER et HAIN en 1994 qui soulignent le fait qu'ils n'ont pas réussi à faire exprimer de façon constitutive un gène de stilbène synthase de l'arachide à un taux élevé chez le tabac, en utilisant le promoteur 35S du CaMV. Selon ces auteurs il y aurait, avec une telle construction, une régulation négative de l'expression du

gène en condition d'attaque de pathogène. Celle-ci, selon leur hypothèse, pourrait résulter de la mise en place par la plante de mécanismes de défense, induits normalement par les pathogènes (synthèse de PR protéines notamment) qui exerceraient une inhibition sur les promoteurs viraux.

B) Transformations génétiques du 41B par des vecteurs ayant le gène vst1 sous contrôle de promoteurs inductibles par des stress abiotiques et/ou biotiques

1) Etude de l'expression des gènes vst et de leurs cinétiques d'induction par U.V. sur feuilles excisées, isolées en survie et sur plante entière de vitroplants de vigne 41B témoins ou transformés par l'insert de 13 kb

Il a été montré que la synthèse de resvératrol (phytoalexine principale de la vigne), produit de la réaction catalysée par une enzyme stilbène synthase, était inductible par les ultraviolets (U.V.), donc sous conditions de stress abiotique (LANGCAKE et al., 1977 ; SBAGHI et al., 1993). En conditions normales, la vigne ne synthétise pas ou très peu de resvératrol, par contre après induction aux U.V. (exposition de 10 minutes aux U.V. à 254 nm, pour une lampe dissipant $600 \mu\text{W}.\text{cm}^{-2}$), suivie d'une période de 20 heures d'obscurité, la phyto-alexine est synthétisée dans les feuilles excisées.

a) Méthode utilisée

Irradiation des feuilles :

- feuilles de vitroplants : à 254 nm pendant 13 minutes pour une lampe dissipant $600 \mu\text{W}.\text{cm}^{-2}$,
- feuilles isolées de vitroplants ou vitroplants : à 254 nm pendant 8 minutes pour une lampe dissipant $600 \mu\text{W}.\text{cm}^{-2}$,
- extraction et analyse des ARNms du matériel végétal et estimation du resvératrol par fluorescence après excitation à 365 nm à un temps donné après l'induction.

Chaque échantillon est constitué par 3 feuilles isolées d'un même plant, induites séparément aux U.V. mais réunies pour l'extraction et le dosage. Le test est réalisé sur des feuilles excisées, isolées de vitroplants, ou sur

des vitroplants en culture sur milieu gélosé, possédant 6 à 7 feuilles bien développées. Les trois feuilles les plus âgées de chaque plantule sont prélevées et utilisées pour le test. L'exposition aux U.V. est effectuée sur leur face supérieure. Après analyse, les quantités de resvératrol obtenues sont exprimées en μg de produit rapportés soit au gramme de poids frais de feuilles analysées, soit au gramme de matière sèche (évaluée sur le culot, après centrifugation après l'extraction méthanolique) ou en mg de resvératrol par g de chlorophylle.

Dans les tableaux ci-dessous, sont indiquées les valeurs obtenues pour des clones de 41B, 55-X, transformés par la construction du clone génomique de 13 kb, où sont présents, dans la séquence utilisée comme insert, deux gènes complets *vst1* et *vst2*, gènes tous deux sous contrôle de leurs propres promoteurs.

b) Etude de stress abiotique (U.V.) sur feuille excisée (expérience N° 1)

Les résultats, correspondant à la construction 55 (insert 13 kb) et aux clones 2 (55-2) et 3 (55-3), sont présentés dans les tableaux 3 et 4 ci-dessous (dosage du resvératrol) et représentés par les figures 6 et 7 (analyse des transcrits). L'étude de la cinétique d'induction par U.V. de l'expression des gènes codant pour la stilbène synthase a été réalisée après une période séparant l'induction par les U.V. des analyses fixée à 17 heures (cf. tableau 3 et Figure 6), ou variant de 0, 8, 17, 24 ou 32 heures après induction (cf. tableau 4 et Figures 7 et 8).

Tableau 3 : Quantités de resvératrol détectées dans les feuilles témoins et transformées, non induites ou 17 heures après induction aux U.V. (exprimées en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de matière fraîche)

Témoins non transformés		Clone 55-2		Clone 55-3	
Non induit	Induit	Non induit	Induit	Non induit	Induit
0	12	0	11	0	13

Légende du tableau 3 : Les feuilles ont été excisées de vitroplants de 41B avant induction aux U.V.. Les clones 55-2 et 55-3 correspondent à des plantes transformées ayant intégré un insert de 13 kb contenant des gènes codant pour une stilbène synthase.

La fluorescence, observée dans le bleu-violet à environ 450 nm, est très forte dans les nervures des feuilles excisées et répartie uniformément sur la totalité de la surface de la feuille. Les feuilles témoins, non induites aux U.V., ne présentent pas, quant à elles, de fluorescence. Ces résultats mettent en évidence une expression spécifique des gènes codant pour des stilbène synthases. L'analyse des transcrits par Northern blot, réalisée par la sonde *vst1*, montre la présence d'un fragment d'environ 1,8 kb dont le signal émis est très intense chez les feuilles induites aux U.V. alors qu'il est absent ou très faible chez les plantes non induites (cf. Figure 6).

Tableau 4 : Cinétique de l'évolution des concentrations en resvératrol sur des feuilles de vitroplants de 41B, induites aux U.V. prélevées sur les plants en culture sur milieu gélosé, puis isolées et analysées pour leur contenu en resvératrol à différentes périodes après induction.

Temps après induction (h)	Quantité de resvératrol (en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de Matière Fraîche)		
	Témoin	PCT 55-2	PCT 55-3
NI	0	0	0
0	0,6	0	0
8	30,8	12,1	9
17	56,8	71,7	47
24	83,2	81,4	35,2
32	15,5	7,7	151,8

Légende du tableau 4 : Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de matière fraîche. Deux plantes transformées PCT 55-2 et PCT 55-3 ont été analysées en comparaison avec le témoin.

NI : Non induit aux U.V..

Dans ces conditions, après stress aux U.V., la quantité de resvératrol retrouvée dans les feuilles témoins est maximale 24 heures après l'induction (de l'ordre de $80 \mu\text{g.g}^{-1}$ m.f. pour le 41B). Cependant, des variations importantes existent selon la date de l'analyse dans le cycle de repiquage des vitroplants : cycle de micro-bouturage.

Les résultats obtenus après analyse par Northern blot, en utilisant la sonde *vst1* sont présentés à la Figure 7. Au moins deux types de transcrits, de tailles très proches (environ 1,8 kb), ont été détectés. Bien qu'une hybridation croisée avec un transcrit de chalcone synthase ne soit pas à exclure, les différents ARNs messagers reconnus correspondent vraisemblablement à l'expression de différents gènes de stilbène synthase. Il a en effet été

montré chez la vigne (WIESE et al., 1994 ; KINDL, communication personnelle) que des différences existaient dans les cinétiques d'induction des différents gènes de la famille multigénique codant pour les stilbène synthases.

5 L'analyse par Northern blot a mis en évidence que chez les feuilles excisées de vigne 41B, soumises ensuite au stress abiotique que constitue l'exposition aux U.V., les transcrits de stilbène synthase présentent un maximum d'expression environ 17 heures à 32 heures après induction.
10 Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec des cultures de cellules de vigne qui ont montré elles aussi le même modèle d'expression mais avec la présence de deux maxima (WIESE et al., 1994).

c) Etude de stress abiotique (U.V.) sur feuille isolée
15 en survie (expérience N° 2), induction sur vitro-plants
avant isolement des feuilles

Le tableau 5 ci-dessous présente les résultats obtenus pour une seconde série de transformants ayant intégré l'insert de 13 kb. L'étude de la cinétique
20 d'induction par U.V. de l'expression des gènes codant pour la stilbène synthase a été réalisée après une période séparant l'induction par les U.V. des analyses variant de 20, 40 ou 60 heures.

Tableau 5 : Concentration en resvératrol de feuilles isolées de vitroplants de vigne après induction aux ultra-violets et extraction à différents temps de survie.

Temps de survie des feuilles isolées de vitroplants après induction aux U.V. (8mn à 254 nm) et avant extraction du resvératrol			
Clone étudié	20 heures	40 heures	60 heures
41B - Témoin non induit	0	0	0
41B - Témoin induit	281	165	6
Clone 55-2 induit	135	918	58
Clone 55-3 induit	44	931	301
Clone 55-5 induit	392	83	657
Clone 55-6 induit	339	235	43
Clone 55-7 induit	263	411	148
Clone 55-9 induit	386	823	54

5

Légende du tableau 5 :

Les concentrations en resvératrol sont exprimées en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de matière sèche.

41B porte-greffe hybride *V. vinifera* Chasselas x *V. Berlandierri*.

10

Les résultats présentés dans le tableau 5 permettent de distinguer deux groupes de plantes :

- le premier correspond au témoin et à deux des transformants 55-6 et 55-7. Ils présentent en général un maximum de concentration en resvératrol compris entre 280

15

et $410 \mu\text{g.g}^{-1}$ matière sèche et cela en général 20 heures après l'induction sauf pour le clone 55-7 où il est situé à 40 heures ;

- le second groupe présente quant à lui des maxima plus élevés soit presque le double du premier (820 à $930 \mu\text{g.g}^{-1}$ matière sèche). Il est constitué uniquement de transformants (55-2, 55-3 et 55-9). Le maximum est exprimé 40 heures après l'induction aux U.V., par contre, 20 heures après induction, ces plantes ont souvent des concentrations très inférieures à celles du premier groupe. C'est le cas par exemple des clones 55-2 et 55-3 (135 et $44 \mu\text{g.g}^{-1}$ de matière sèche respectivement). L'un des clones, 55-9, est cependant intéressant puisqu'il montre des concentrations en resvératrol supérieures à celles du témoin dans tous les cas (386 , 823 et $54 \mu\text{g.g}^{-1}$ de matière sèche pour des temps de 20, 40 et 60 heures après induction).

Dans ce système de feuille en survie, un témoin non induit ne présente jamais de resvératrol et dans presque tous les cas (hormis le clone 55-5 qui a un comportement particulier), la concentration en resvératrol chute de manière drastique 60 heures après induction.

d) Etude de stress abiotique (U.V.) effectuée sur vitroplants en culture sur milieu gélosé

Cette étude, effectuée sur plante en croissance sur milieu gélosé, permet d'analyser la production de resvératrol en condition d'expression éventuelle d'autres mécanismes de défense de la plante, tout au moins ceux susceptibles de s'exprimer dans les conditions de culture in vitro. De plus, elle permet de suivre la synthèse de resvératrol sur une période plus longue (dans les études précédentes, la feuille isolée se nécrose au-delà de 72 heures).

Quatre clones de vitroplants en culture de 41B transformés (55-2, 3, 5, 6) ont été traités par les U.V.

dans les mêmes conditions que précédemment (8 min à 254 nm), les feuilles n'étant prélevées sur la plante que 20 heures après induction. Les résultats obtenus ont été comparés au témoin non transformé ainsi qu'à un clone de *Vitis rupestris* et à 3 clones de cépage *Vitis vinifera*, connus sur le terrain pour avoir une sensibilité plus ou moins grande aux attaques de *Botrytis* sur les baies.

La littérature (SBAGHI et al., 1993) montre en effet qu'une corrélation existe entre la sensibilité des baies à *Botrytis*, évaluée au vignoble, et la teneur en resvératrol de feuilles de vitroplants induites aux U.V.. Les résultats sont présentés au tableau 6 ci-dessous.

Tableau 6 : Résultats des dosages du resvératrol par H.P.L.C. réalisés 20 h après induction 8 mn aux U.V. 254 nm sur différentes variétés de vigne.

Variété testée	(resvératrol) $\mu\text{g.g}^{-1}$ poids sec
Rupestris 215	351
Porte-greffe 41B	237
Ugni-blanc 479	209
Pinot noir 386	86
Folle blanche 280	37
Pct 55-2	361
Pct 55-3	235
Pct 55-5	115
Pct 55-6	539

Légende du tableau 6 :

L'induction aux U.V. est réalisée sur des vitroplants en culture sur milieu gélosé. Les feuilles sont prélevées et extraites pour analyse 20 heures après le traitement.

PCT 55-2, 3, 5, 6 - transformants ayant intégré l'insert 13 kb dans leur génome. Les résultats représentent la moyenne de 3 répétitions.

5 Ces résultats indiquent bien qu'une corrélation existe chez les variétés et cépages entre sensibilité à *Botrytis* et teneur en resvératrol des feuilles 20 heures après induction. Deux groupes sont identifiables parmi les variétés et cépages non transformés. Le premier, formé de
10 *V. ruspestris*, *V. vinifera* x *V. berlandieri* (41B) et Ugni-blanc, correspond à celles et à ceux qui sont relativement tolérants au champignon. Le second, constitué du Pinot noir et de la Folle blanche représente ceux considérés comme moyennement tolérants voire très sensibles (Folle blanche
15 par exemple).

Les transformants ont, quant à eux, en moyenne, des teneurs en resvératrol, 20 heures après induction, supérieures ou égales au témoin non transformé 41B (539, 362 et 236 $\mu\text{g.g}^{-1}$ matière sèche pour respectivement les
20 clones 55-6, 55-2 et 55-3 et 237 pour le témoin).

Pour le clone transformé 55-5 par contre, la concentration obtenue est la moitié de celle du témoin. Si l'on compare ces valeurs, exprimées en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec, à celles des feuilles isolées (tableau 5), on s'aperçoit
25 qu'elles sont similaires pour le témoin mais par contre que les variations existent pour les transformants analysés 20 heures après induction. Celles-ci sont quelquefois très importantes (135 pour l'induction sur feuilles isolées et 362 pour induction sur vitroplants pour le clone 55-2 ; 44
30 contre 236 pour le clone 55-3 ; 392 contre 116 pour le clone 55-5 et 339 contre 540 pour 55-6). De plus, une grande variabilité existe entre les différentes répétitions.

2) Etude comparée de l'expression du gène *vst* et de sa
35 cinétique d'induction par stress biotique sur vitroplants de vigne 41B, transformés par l'insert de 13 kb et par la

construction comprenant uniquement le gène *vst1* sous contrôle du promoteur PMS PR10-1.

Les résultats ci-dessus (chapitre 1), obtenus sur des vitroplants ayant intégré par transformation génétique des copies supplémentaires des gènes de stilbène synthase (sous forme d'un insert de 13 kb comprenant deux séquences fonctionnelles *vst1* et *vst2*), montrent qu'une surproduction de resvératrol, produit de la réaction catalysée par l'enzyme stilbène synthase, est possible dans certains transformants lorsque ces gènes sont sous contrôle de leurs propres promoteurs et en réponse à un stress abiotique tel que l'irradiation par les U.V..

Par rapport à ces résultats, la production de resvératrol sur deux types de transformants a ensuite été vérifiée, le premier représentant un clone de 41B ayant intégré l'insert de 13 kb (gènes de stilbène synthase *vst1* et *vst2* sous contrôle de leurs propres promoteurs), le second plusieurs clones ayant incorporé le gène *vst1* seul sous contrôle de la séquence de régulation de gènes de défense de la luzerne PMS-PR10-1. Cette comparaison a été faite après induction par un stress biotique causé par *Botrytis cinerea*.

a) Méthodes utilisées

α) Mise en évidence de la fongitoxicité de la molécule resvératrol sur *Botrytis cinerea*

Les données de la littérature sur la molécule en tant que fongitoxique sont contradictoires. Selon DAI (1994), le resvératrol montre bien une action inhibitrice sur le développement des zoospores de *Plasmopora viticola* (agent du Mildiou). Par contre, selon PONT et PEZET (1990) il ne bloque pas la germination des conidies de *Botrytis cinerea*.

L'action de la molécule a été étudiée sur la croissance des hyphes mycéliens de *Botrytis cinerea* en culture sur un milieu Malt-Agar, comprenant une gamme de

dilution de resvératrol variant de 10^{-1} M à $3,7.10^{-3}$ M et incubés à température ambiante 7 jours. Les résultats ont montré une action inhibitrice de la molécule ($CI_{50} = 500$ $\mu\text{moles.l}^{-1}$), avec diminution exponentielle du diamètre moyen de croissance du champignon pour des concentrations supérieures à $125 \mu\text{moles.l}^{-1}$. Par contre, des concentrations de $37 \mu\text{moles.l}^{-1}$ n'inhibent que très peu la croissance du mycélium (cf. Figure 9). Cette inhibition est cependant levée progressivement après 7 jours de culture dans ces conditions, par ailleurs très favorables à la croissance du champignon. Au bout de 20 jours, le champignon finit par contaminer l'ensemble de la surface de culture.

β) Test de criblage de la tolérance de vitroplants de vigne à *Botrytis cinerea*

Le test mis au point a consisté à inoculer des feuilles de plantules, cultivées in vitro sur milieu de microbouturage, par dépôt sur leur face supérieure de $20 \mu\text{l}$ d'une suspension de conidies à 1.10^{-4} conidies.ml $^{-1}$ (200 conidies par dépôt) dans un milieu malt-glucose. Les plantules, ainsi inoculées sur 4 feuilles différentes, sont cultivées ensuite en chambre climatique (photopériode 16 h jour, 8h nuit ; température 24°C ; humidité 70 %). Deux jours après l'inoculation, les feuilles de rang 4, les plus jeunes, ont été observées (nécroses et macérations présentes dénombrées grâce à une caméra reliée à un moniteur de télévision) et extraites au méthanol pour permettre de doser le resvératrol synthétisé en réponse à l'attaque par *Botrytis*. A 5 jours, les feuilles numéro 2 ont été prélevées pour être observées en microscopie à fluorescence. Une observation macroscopique (nécroses et macérations sur les feuilles) et un dénombrement des feuilles présentant des organes de fructification du champignon (conidiophores) ont aussi été réalisés sur les feuilles numéro 3. Enfin à 9 jours, des feuilles en

interaction avec le champignon, prélevées sur trois plantes différentes, ont été extraites par le méthanol pour doser le resvératrol.

5 γ) Induction de stress biotique par dépôt de
suspension contenant des spores de *Botrytis cinerea* sur des
feuilles de vitroplants - test de tolérance à *Botrytis*

 Ce test de confrontation directe a été réalisé selon la technique déjà décrite (cf. paragraphe précédent). Il en est de même pour les observations effectuées. Pour
 10 chaque variété ou clone transformé, quatre vitroplants ont été utilisés et pour chacun d'entre eux trois feuilles développées de rang 2, 3, 4 ont été inoculées par la suspension de conidies (200 conidies dans 20 µl de milieu malt-glucose). Douze inoculations ont donc été réalisées
 15 pour chaque variété ou clone et les analyses et les observations suivantes ont été faites :

♦ Deux jours après inoculation :

 - observation des feuilles de rang 4 pour les symptômes foliaires (zone de macération du champignon ou spots
 20 nécrotiques, constitués de petites zones brun noir, localisées autour des spores de champignon, ou sans symptômes visibles), et

 - dosage du resvératrol sur ces mêmes feuilles.

♦ Cinq jours après inoculation :

25 - observation des feuilles de rang 3 pour les symptômes foliaires avec dénombrement de celles qui portent des conidiophores (organes de fructification du champignon), et

 - observation en microscopie à fluorescence des feuilles de rang 2 pour localisation des zones de synthèse du
 30 resvératrol.

♦ Neuf jours après inoculation :

 - dosage du resvératrol dans trois feuilles, issues de trois plantes différentes, en interaction avec le parasite.

35 Pour chaque série expérimentale, trois cépages de *Vitis vinifera* ayant des sensibilités différentes aux attaques de *Botrytis* sur les baies ont été étudiés : Folle

blanche (sensible), Pinot noir (moyennement tolérant), Ugni-blanc (tolérant) et le porte-greffe 41B (tolérant) ainsi que quatre de ses transformants : l'un ayant inséré des copies surnuméraires des gènes codant pour une stilbène synthase (insert 13 kb), clone 55-3 et les trois autres, représentant des transformants de la construction promoteur PMS PR10-1-gène *vst1* soient les clones 145-2, 145-5 et 145-6.

b) Résultats obtenus

Les résultats sont présentés dans les tableaux 7 et 8, pour les symptômes foliaires observés 2 ou 5 jours après l'inoculation et, dans les tableaux 9 et 10, pour les dosages de resvératrol rapportés soit au poids sec, soit à la teneur en chlorophylle.

Tableau 7 : Observations macroscopiques des interactions feuilles de vitroplants-*Botrytis cinerea* à 2 jours

Variété testée	Nombre de feuilles n° 4, observées sur 4 plantes différentes, où apparaissent les symptômes suivants		
	Zones de macération	Spots nécrotiques	Aucun symptôme visible
Folle blanche 280	4	1	0
Pinot noir 386	3	4	0
Ugni-blanc 479	1	2	1
41B	0	4	0
Pct 55-3	2	3	0
Pct 145-2	0	3	1
Pct 145-5	0	1	3
Pct 145-6	1	1	2

Légende du tableau 7 :

- Zones de macération : zone large et diffuse où *Botrytis* détruit rapidement les cellules végétales. Ces zones ont une couleur beige marron clair.

5 - Spots nécrotiques : zones très petites circonscrites autour du champignon. Ces spots sont de couleur brun-noir.

Tableau 8 : Observations macroscopiques des interactions feuilles de vitroplants-*Botrytis cinerea* à 5 jours

10

Variété testée	Nombre de feuilles n° 3, observées sur 4 plantes différentes, où apparaissent les symptômes suivants		
	Zones de macération	Spots nécrotiques	Aucun symptôme visible
Folle blanche 280	4	0	4
Pinot noir 386	3	1	2,5
Ugni-blanc 479	2	1	0,5
41B	1,5	2	0,5
Pct 55-3	2	2	1
Pct 145-2	1,5	2	1
Pct 145-5	0,5	4	0
Pct 145-6	3	2	1

Légende du tableau 8 :

- Zones de macération : zone large et diffuse où *Botrytis* détruit rapidement les cellules végétales. Ces zones ont une couleur beige marron clair.

15

- Spots nécrotiques : zones très petites circonscrites autour du champignon. Ces spots sont de couleur brun-noir.

Tableau 9 : Résultats des dosages du resvératrol par H.P.L.C. sur différentes variétés de vigne en interaction avec *Botrytis cinerea* depuis 2 jours

Variété testée	resvérat. mg.g ⁻¹ chloroph.	resvérat. µg.g ⁻¹ poids sec
Folle B280	5,1	101
Pinot N386	4,3	102
Ugni B479	3,9	86
Porte-g41B	5,7	112
Pct 55-3	4,6	118
Pct 145-2	6,9	170
Pct 145-5	2,2	83
Pct 145-6	4,3	107

5

Légende du tableau 9 :

- resvérat. : resvératrol ; chloroph. : chlorophylle

Folle B 280 : Folle blanche 280 ; Pinot N 386 : Pinot noir 386 ; Ugni B 479 : Ugni-blanc 479 ; Porte-g41 B : Porte-greffe 41B.

10

Tableau 10 : Résultats des dosages du resvératrol par H.P.L.C. sur différentes variétés de vigne en interaction avec *Botrytis cinerea* depuis 9 jours

15

Variété testée	resvératrol mg.g ⁻¹ chlorophylle	resvératrol µg.g ⁻¹ poids sec
Folle blanche 280	4,0	38
Ugni-blanc 479	31,7	145
Porte-greffe 41B	11,9	59
Pct 145-5	602,1	2558

◆ Deux jours après inoculation :

L'observation a porté sur les feuilles les plus jeunes (rang 4). Dans presque tous les cas, hormis le 41B et les clones 145-2 et 145-5, des zones de macération ont été observées (colonisation du champignon). Les cépages sensibles en ont présenté plus que les cépages tolérants : Folle blanche et Pinot noir respectivement 4 et 3 zones contre 1 seulement pour le cépage Ugni-blanc. Seuls les transformants 145 (promoteur PMS PR10-1-gène *vst1*) et l'Ugni-blanc ont donné des feuilles sans symptômes visibles. Les zones nécrotiques, réaction de défense de la plante, sont apparues principalement sur le 41B et ses transformants et, pour les cépages, sur Pinot noir et Ugni-blanc.

Si l'on compare ces observations aux dosages de resvératrol (tableau 9), aucune corrélation ne peut être établie puisque, ramenées au poids sec, les teneurs en resvératrol de ces feuilles sont comparables avec environ $100 \mu\text{g.g}^{-1}$ de matière sèche. Elles s'établissent pour l'ensemble des vitroplants examinés à des valeurs comprises entre 4 et 5 mg.g^{-1} chlorophylle.

Seuls le porte-greffe 41B et surtout le transformant 145-2 ont des valeurs supérieures. Le clone 145-5 quant à lui a une valeur plus faible (de moitié environ).

Une comparaison peut aussi être établie avec les teneurs en resvératrol obtenues précédemment 20 heures après induction des vitroplants aux U.V. (tableau 6). Bien que la période de prélèvement ne soit pas comparable (20 heures pour le stress abiotique contre 48 heures pour les stress biotiques, mais il faut prendre en compte le temps nécessaire à la germination des spores), on constate en général des teneurs plus faibles en resvératrol après un stress biotique (de moitié ou du tiers, cas de l'Ugni-blanc), sauf pour le Pinot noir où elle est comparable et

pour la Folle blanche où elle est environ trois fois plus forte.

5 Dans tous les échantillons analysés, on peut souligner une forte dispersion des valeurs obtenues dans les différentes répétitions effectuées. Cette variabilité entre différentes feuilles d'un même plant, déjà observée avec les échantillons ayant subi les inductions aux U.V., pourrait, là aussi, avoir plusieurs origines. Parmi les hypothèses les plus plausibles, on peut citer :

10 Une grande variabilité de réaction entre vitroplants d'un même clone face à l'agression du champignon. Les symptômes foliaires variables, obtenus après inoculation par les spores de *Botrytis* semblent le confirmer (variabilité dans l'infection, dans l'état
15 physiologique de chaque plante, etc.).

Le dosage, effectué sur la feuille entière, n'est pas représentatif des variations de synthèse du resvératrol existant au niveau de chaque cellule qui la compose. Il est, en effet, généralement admis que, dans les réactions
20 d'hypersensibilité à un parasite, toutes les cellules du limbe ne synthétisent pas les molécules de défense. Seules sont induites à la synthèse de phytoalexines les cellules situées près des zones d'attaque du champignon. Les analyses, réalisées dans ce test, ne représentent donc que
25 des valeurs correspondant à un taux moyen de resvératrol présent dans le limbe des feuilles en interaction avec le parasite. Un phénomène de dilution important peut donc se produire, notamment pour les plantes résistantes, entre les concentrations présentes dans les cellules induites à la
30 synthèse de la phytoalexine et la valeur trouvée lors de l'analyse de la feuille entière. Ceci est sans doute plus marqué dans la première période d'expression des réactions de défense de la plante.

♦ Cinq jours après l'inoculation :

35 Les observations des symptômes montrent (planches photos n° 1 et 2 (Figures 10 et 11) et tableau 8) que des zones de macération sont formées, en plus ou moins grand

nombre, chez tous les cépages, porte-greffe et transformants étudiés. Celles-ci sont souvent associées à la présence de conidiophores (organes de fructification du champignon). Parmi les cépages et le porte-greffe 41B témoin, la Folle blanche, espèce la plus sensible à *Botrytis*, présente des attaques sur toutes les feuilles étudiées et aussi des conidiophores. Si l'on établit une hiérarchie dans la gravité des symptômes viennent ensuite le Pinot noir, puis l'Ugni-blanc et enfin le 41B. Cependant, pour ces deux derniers, les conidiophores ne sont développés que sur une demi-feuille seulement. En ce qui concerne les clones transformants, trois clones ont donné des réactions plus ou moins similaires : 55-3, 145-2 et 145-6. Seul le clone 145-5 a présenté une bonne tolérance au parasite, puisqu'une demi-feuille seulement a permis le développement d'une zone de macération et aucun conidiophore n'est visible.

Par contre, pour ce clone, la majorité des feuilles a réagi à l'agression en formant des zones nécrotiques. Un exemple est d'ailleurs présenté sur la planche photo 2 (Figure 11).

Pour vérifier si ces résultats correspondaient bien à des différences notables dans l'induction de la synthèse du resvératrol et donc à l'expression de gène(s) codant pour une stylbène synthase, des feuilles, inoculées par les spores de *Botrytis*, ont été observées en microscopie à fluorescence (équipé du filtre A : filtre excitation de 340 à 380 nm ; filtre d'arrêt à 425 nm). Dans ces conditions, la chlorophylle fluoresce en rouge, le resvératrol en blanc bleuté ou bleu plus foncé selon sa concentration. Deux cépages, Folle blanche (sensible) et Pinot noir (moyennement tolérant), le porte-greffe 41B (tolérant) et un de ses transformants 145-5 (construction Promoteur PMS PR10-1-gène *vst1*) ont été étudiés par cette méthode. Les photographies de ces observations sont présentées planche photo 3 (Figure 12). Des différences remarquables sont visibles. Sur la Folle blanche, le

mycélium du parasite (en noir sur la photo) s'est développé et a colonisé les tissus. Pratiquement aucune cellule bleutée n'est observable. Sur le cépage Pinot noir on note une zone bleutée formant barrière autour et dans la zone d'inoculation et de début de colonisation du champignon. La croissance du mycélium est ralentie voire bloquée par cette barrière, même si un processus de macération des tissus a déjà été engagé. Une coloration bleue plus intense existe aussi dans les nervures. Sur le porte-greffe 41B témoin, dans la zone étudiée, des cellules éparses, réparties dans tout le limbe, montrent une fluorescence bleue claire avec une intensité plus grande dans les nervures. Aucun processus de colonisation du champignon n'a été engagé et des zones nécrotiques éparses, limitées à quelques cellules, sont visibles. Sur le 41B transformé par la construction promoteur PMS PR10-1-gène *vst1*, les résultats sont spectaculaires pour le clone 145-5. Un début de colonisation des tissus par le champignon a été engagé (zone noire) mais, très vite, une barrière cellulaire, synthétisant du resvératrol, s'est formée autour de cette zone, bloquant ainsi son extension. Dans la zone de macération du champignon des cellules bleues sont encore visibles. En outre, une grande partie des cellules du limbe de la feuille qui ne sont pas en contact avec le champignon, ont synthétisé, elles aussi, du resvératrol. Les nervures aussi présentent une intense coloration bleue.

Ces observations mettent en évidence qu'il existe donc une corrélation entre l'intensité des symptômes foliaires, développés après inoculation de vitroplants par des spores de *Botrytis*, et la teneur en phytoalexine de type stilbénique des feuilles. Les plantes les plus tolérantes sont celles qui présentent une synthèse de resvératrol répartie sur une grande partie du limbe. Ceci est réalisé avec le transformant 145-5, comportant un gène codant pour une stilbène synthase sous contrôle du promoteur PMS PR10-1, isolé de la luzerne.

♦ Neuf jours après inoculation :

Les observations des symptômes ont montré que les vitroplants de Folle blanche étaient aussi dans ce test particulièrement sensibles aux attaques de *Botrytis*. A neuf jours, ils sont tous envahis par le champignon et ont, dans la plupart des cas, une forte dégradation de leur chlorophylle. En ce qui concerne le cépage Ugni-blanc et le porte-greffe 41B, aucune différence n'a pu être constatée dans l'expression des symptômes foliaires. D'une manière générale, les résultats des observations des symptômes effectuées à cinq jours sont retrouvés en un peu plus développés pour les zones de macération. Par contre, les feuilles qui présentaient des conidiophores se sont nécrosées dans la plupart des cas.

4 variétés ont été analysées pour leur teneur en resvératrol : la Folle blanche (sensible), l'Ugni-blanc (tolérant), le 41B (tolérant) et le 145-5 (41B transformé Promoteur PMS PR10-1-gène *vst1*). Pour le 145-5, neuf jours après inoculation, il ne présentait toujours pas de symptômes notables d'attaque par *Botrytis*. Les résultats des analyses de teneur en resvératrol sont présentés tableau 10. Exprimées en μg de resvératrol. g^{-1} de poids sec ou en $\text{mg}.\text{g}^{-1}$ de chlorophylle, les concentrations de resvératrol permettent le classement suivant des variétés, en allant de la plus faible valeur vers la plus forte : Folle blanche < 41 B < Ugni-blanc < 41B transformé 145-5.

Les différences de concentration sont très importantes, puisque le transformant 145-5 a une valeur près de 43 fois supérieure à celle du 41B témoin (en g^{-1} de poids sec) et de 50 fois supérieure si elle est exprimée en g^{-1} de chlorophylle. Les dosages confirment donc bien les évaluations effectuées en microscopie à fluorescence à cinq jours (voir planche photo 3, figure 12).

En ce qui concerne l'Ugni-blanc et le 41B, le tableau 10 montre que le premier a environ 3 fois plus de resvératrol que le second, quelles que soient les unités

choisies. Pourtant, ces deux variétés réagissent de manière identique en terme de symptômes foliaires. D'autres phénomènes que la synthèse de resvératrol peuvent être mis en jeu pour expliquer cette similitude de tolérance. Il faut noter aussi que dans les conditions du test, la confrontation plante-*Botrytis* est particulièrement favorable à ce dernier. Les conditions d'environnement existant dans un conteneur in vitro font qu'après 20 jours de culture environ, tous les vitroplants quels qu'ils soient, sont infectés par le champignon.

c) Conclusions sur la transformation génétique de la vigne et l'analyse de l'efficacité des promoteurs étudiés

Les expériences sur cellules embryogènes de 41B (porte-greffe hybride *V. Vinifera* x *V. Berlandieri*) transformées par *Agrobacterium tumefaciens* comprenant les différentes constructions, n'ont pas permis de régénérer des plantes avec les constructions qui comportaient le gène *vst1* sous contrôle du promoteur 35S ou de ses dérivés. Aucune activité constitutive forte sur l'ensemble de la plante n'a donc pu être obtenue.

Par contre, des plants de vigne ayant incorporé les constructions PMS PR10-1-gène *vst1* et insert 13 kb (gènes *vst1* et *vst2* sous contrôle de leurs propres promoteurs) ont été obtenus. Ces plantes, transformées génétiquement, ont pu être comparées au témoin (41B non transformé) et multipliées par micropropagation.

Comparées aux témoins non transformés, peu de différences ont pu être constatées sous stress U.V. (stress biotique) dans les concentrations en resvératrol des différents transformants obtenus avec l'insert de 13 kb, où sont présents dans la séquence utilisée comme insert deux gènes *vst1* et *vst2*, gènes tous deux sous contrôle de leurs propres promoteurs.

Par contre, les résultats montrent que la construction chimérique PMS PR10-1-gène *vst1* permet une surexpression de la phytoalexine resvératrol (produit de la

réaction catalysée par une stilbène synthase), en présence d'un stress biotique causé par *Botrytis cinerea* de l'ordre de 50 fois plus, 9 jours après infection. Ces plantes montrent alors une meilleure tolérance si on les compare soit au témoin, soit à des transformants obtenus avec l'insert 13 kb.

Ainsi, la transformation avec la construction associant le promoteur inductible PMS PR10-1 de luzerne avec les gènes de stilbène synthase, permet de surexprimer dans les plants de vigne les gènes de stilbène synthase en réponse à un stress comme par exemple l'attaque d'un pathogène.

Références

- BEVAN M., 1984. Binary Agrobacterium vectors for plants transformation. Nucl. Acid. Res., 12, 8711-8721.
- 5 BLONDON F., 1964. Contribution à l'étude du développement des graminées fourragères : Ray gras et Dactyle. Rev. Gén. Bot., 71, 293-381.
- 10 CASSE-DELBART, F., 1996. La transgénèse Végétale. Les Plantes Transgéniques en Agriculture, John LIBREY Eurotext, ISBN : 27420-0149-2, 59-88.
- 15 DAÏ G.H., 1994. Etude des facteurs biochimiques de résistance de la vigne (*Vitis spp*) au mildiou (*Plasmora viticola*). Thèse de doctorat de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier (France).
- 20 DITTA G., SCHMIDTHAUSER T., YACOBSON E., LU P., LIANG A.W. et al., 1985. Plasmid related to the broad range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. Plasmid 13, 149-153.
- 25 ESNAULT R., BUFFARD D., BREDA C., SALLAUD C., EL TURK J., KONDOROSI A., 1993. Pathological and molecular characterizations of alfalfa interactions with compatible and incompatible bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *Alfalfae* and *Pseudomonas syringae* pv. *lisi*. Mol. Plant-Microbe Interaction 6, 655-664.
- 30 FISHER R. et HAIN R., 1994. Plant disease resistance resulting from the expression of foreign phytoalexins. Current Opinion in Biotechnology, 5, 125-130.
- 35 HAIN R., REIF H.J., KRAUSE E., LANGEBARTELS R., KINDL H., WORNAM B., WIESE W., SCHMELZER E., SCHREIER P.H., STOECKER R.H. et STENZEL K., 1993. Disease resistance results from

foreign phytoalexin expression in a novel plant. NATURE, 361, 153-156.

5 LANGCAKE P. et PRYCE R.J., 1977. A new class of phytoalexins from grapevines. Experientia, 33, 151-152.

10 MELCHIOR F. et KINDL M., 1991. Coordinate and elicitor dependant expression of stilben synthase and phenyl ammonia lyase genes in Vitis cv optima. Arch. Biochem. Biophys., 288, 2 ; 552-557.

15 MURASHIGE T. et SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissu cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497.

NEGRETIU, I. et GHARTI-CHHETRI, G.B., 1991. A Laboratory Guide for Cellular and Molecular Biology, BIOMETHODS ; SALUZ, H.P. et BECKER, M.M., Series Eds., BIRKHAÜSER VERLAG, 105-122.

20 PETIT A., STOUGAARD J., KUHLE A., MARCKER K.A. et TEMPE J., 1987. Transformation and regeneration of the legume : Lotus corniculatus. A system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. Mol. Gen. Genet. 207, 245-250.

25 PIETRZAK M., SHILLITO R.D., HOHN T. et POTRYKUS I., 1986. Expression in plants of two bacterial antibiotic genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. Nucl. Acids Res. 14 (14), 5857-5869.

30 PONT V. et PEZET R., 1990. Relation between the chemical structure and the biological activity of hydroxystilbenes against Botrytis cinerea. J. Phytopath., 130, 1-8.

35 REAM, W., 1989. Agrobacterium tumefaciens and interkingdom genetic exchange. Ann. Rev. Phytophat., 27, 583-618.

SBAGHI M., 1993. Aspects physiologiques et biochimiques de l'interaction Vigne-Botrytis cinerea. Thèse de doctorat de l'Université de Bourgogne (France).

5 STANFORD, J.C., 1990, Biolistic plant transformation, Physiol. Plant. 79, 206-209.

SZABADOS L., CHARRIER B., KONDOROSI A., De BUIJN F.T. et
10 RATET P., 1995. New promoter and enhancer testing vectors. Molecular Breeding.

VANCANNEYT G., SCHMIDT R., O'CONNOR-SANCHEZ A., WILLMITZER L. et ROCHA-SOZA M., 1990. Construction of an intron-containing marker-gene : splicing of the intron in
15 transgenic plants and its use in monitoring early events in Agrobacterium-mediated transformation. Mol. Gen. Genet. 220, 245-250.

VAN LOON L.C., 1985. Pathogenesis Related Proteins. Plant
20 Mol. Biol. 4, 111-116.

VAN LOON L.C., PIERPOINT W.S., BOLLER T., CONEJERO V., 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis related proteins. Plant Mol. Biol. Rep 12, 245-264.

25 WIESE W., VORNAM B., KRAUSE E. et KINDL H., 1994. Structural organization and differential expression of three stilbene genes located on a 13 kb grapevine DNA fragment. Plant Mol. Biol., 26, 2, 667-677.

30

REVENDICATIONS

1. Acide nucléique comprenant la séquence du promoteur d'une PR protéine de luzerne associée à au moins
5 une séquence d'un gène codant pour une stilbène synthase.

2. Acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce que le promoteur d'une PR protéine de la luzerne est un promoteur inductible dans les plantes,
10 tissus spécifiques ou non, par un stress biotique ou abiotique.

3. Acide nucléique selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que la séquence du promoteur d'une
15 PR protéine de la luzerne est choisie dans le groupe comprenant :

a) la séquence IND S1,
b) toute séquence correspondant à un fragment de la séquence IND S1 et ayant effet de séquence promotrice chez
20 les plantes.

4. Acide nucléique selon la revendication 3, caractérisé en ce que la séquence du promoteur d'une PR protéine de la luzerne présente au moins 80 % d'homologie
25 avec la séquence IND S1.

5. Acide nucléique selon la revendication 3, caractérisé en ce que la séquence du promoteur d'une PR protéine de la luzerne présente au moins 90 % d'homologie
30 avec la séquence IND S1.

6. Acide nucléique selon la revendication 3, caractérisé en ce que la séquence du promoteur d'une PR protéine de la luzerne présente au moins 95 % d'homologie
35 avec la séquence IND S1.

7. Acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la séquence du gène codant pour une stilbène synthase est choisie parmi les gènes isolés à partir des génomes de l'arachide, de l'orchidée, de la vigne et du pin.

8. Acide nucléique selon la revendication 7, caractérisé en ce que la séquence du gène codant pour une stilbène synthase est la séquence d'un gène codant pour une stilbène synthase de vigne.

9. Acide nucléique selon la revendication 8, caractérisé en ce que la séquence du gène codant pour une stilbène synthase de vigne est une séquence choisie parmi :

- a) le gène *vst1*,
- b) le gène *vst2*.

10. Système d'expression d'un gène de stilbène synthase chez les plantes, caractérisé en ce qu'il comporte au moins un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 9.

11. Système d'expression d'un gène de stilbène synthase chez les plantes selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur.

12. Vecteur d'expression selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un plasmide.

13. Système d'expression selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisé en ce qu'il peut être transféré dans des souches d'*Agrobacterium*.

14. Système d'expression selon l'une des revendications 10 à 13, caractérisé en ce qu'il est inductible dans les plantes par un stress biotique ou abiotique.

15. Système d'expression selon la revendication 14, caractérisé en ce que le stress biotique est l'attaque d'un parasite.

5 16. Système d'expression selon la revendication 15, caractérisé en ce que le parasite est une bactérie, une levure, un champignon ou un virus.

10 17. Système d'expression selon la revendication 16, caractérisé en ce que le parasite est *Botrytis cinerea* ou *Plasmopora viticola*.

15 18. Système d'expression selon la revendication 14, caractérisé en ce que le stress abiotique est une blessure mécanique.

20 19. Système d'expression selon la revendication 18, caractérisé en ce que la blessure mécanique est causée par un insecte.

20 20. Système d'expression selon la revendication 18, caractérisé en ce que la blessure mécanique est causée par un phénomène physique tel que le vent ou le gel.

25 21. Cellule végétale transformée par un système ou un vecteur selon l'une des revendications 10 à 20.

30 22. Cellule selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'il s'agit de cellule de vigne.

35 23. Procédé d'obtention de cellule selon l'une des revendications 21 et 22, caractérisé en ce qu'on transforme une cellule végétale à l'aide d'un procédé microbiologique incluant un système ou vecteur selon l'une des revendications 10 à 20.

24. Procédé d'obtention de plantes exprimant un gène de stilbène synthase, caractérisé en ce qu'on transforme des cellules végétales desdites plantes à l'aide d'un système ou d'un vecteur selon l'une des revendications 10 à 20, on sélectionne les cellules exprimant ledit gène et l'on régénère une plante à partir de ces cellules.

25. Plante comportant un système d'expression selon l'une des revendications 10 à 20.

26. Plante comportant des cellules selon l'une des revendications 21 et 22.

27. Plante obtenue par la mise en oeuvre d'un procédé selon l'une des revendications 23 et 24.

28. Plante selon l'une des revendications 25 à 27, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une plante d'intérêt agronomique.

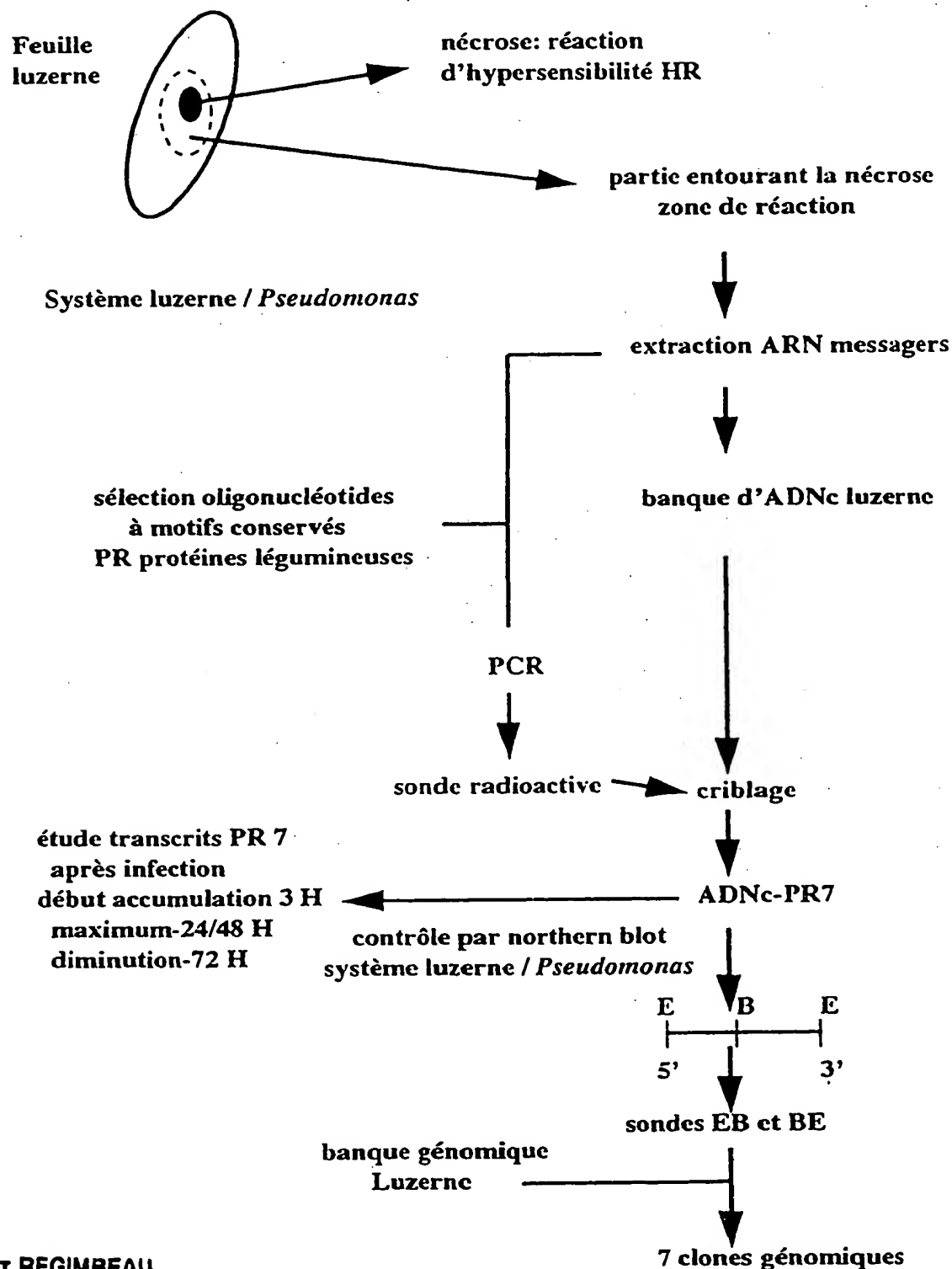
29. Plante selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'il s'agit de la vigne.

ORIGINAL

CABINET REGIMBEAU
CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

26, Avenue Kléber
75116 PARIS

**FIGURE 1: schéma d'isolement du promoteur
PMs PR 10-1**



**FIGURE 1 bis : schéma isolement promoteur
P.Ms PR10-1 (suite)**

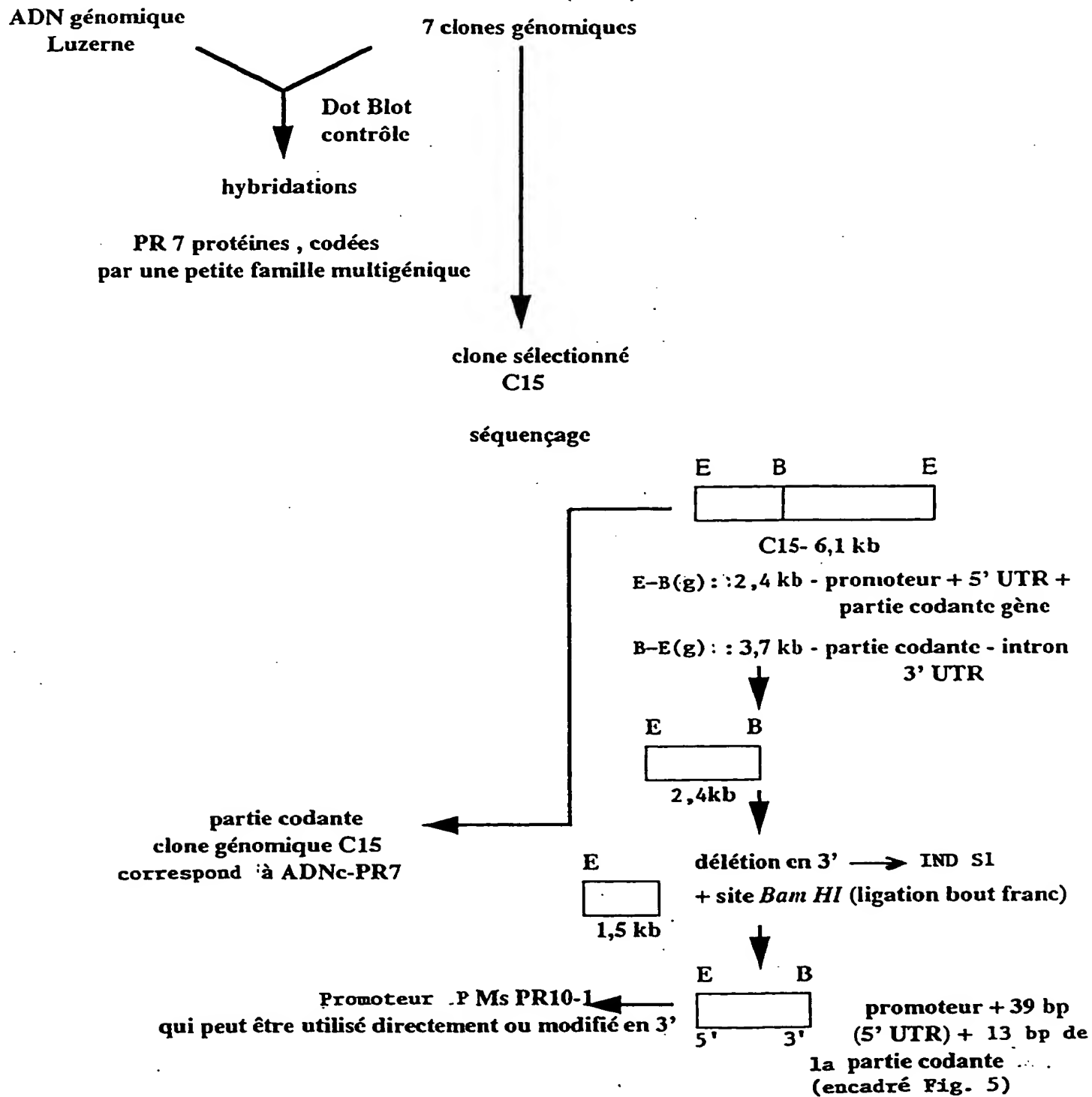
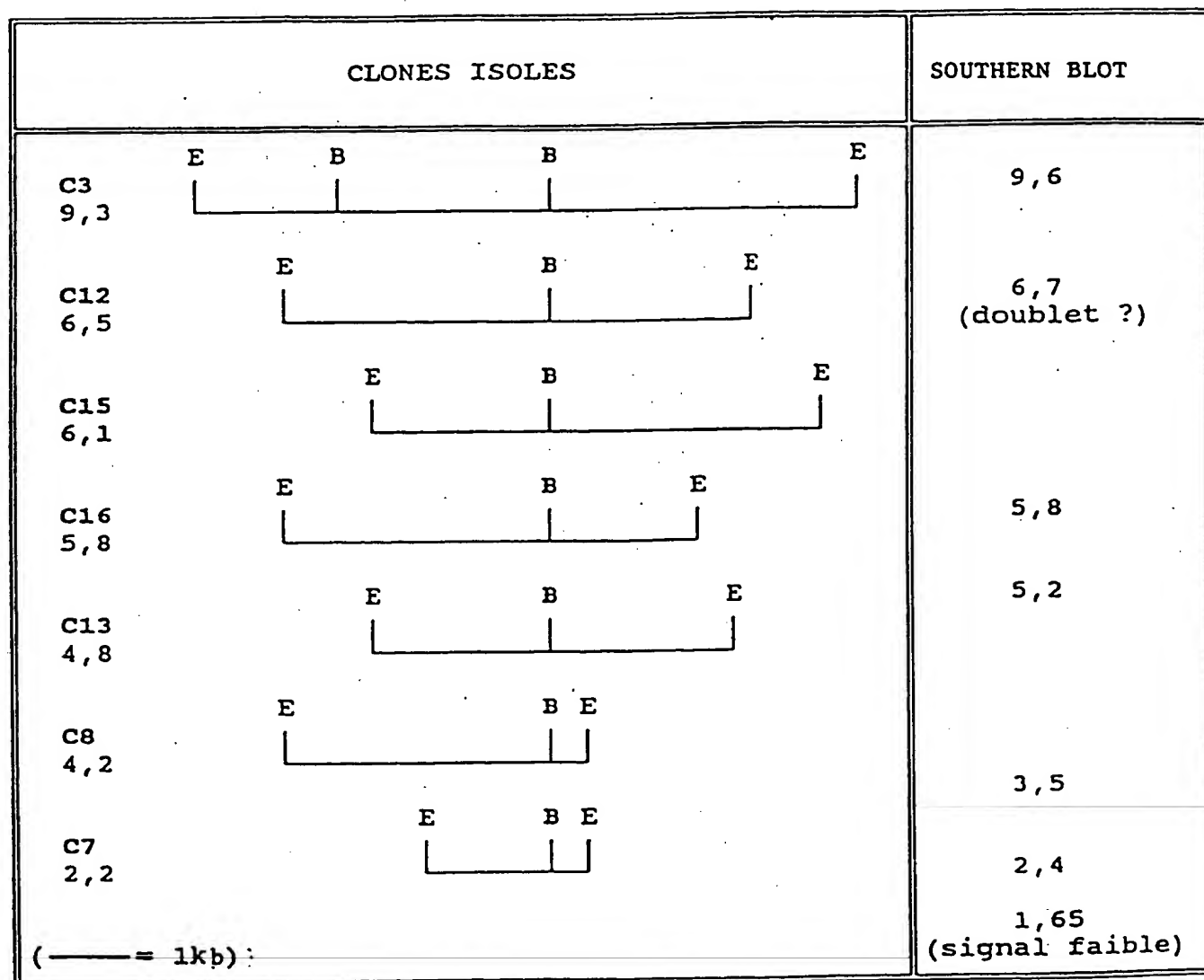


FIGURE 2



GAFIST RECHERCHE

JOURNAL

FIGURE 3

gaattcttcaaaaaaaaaagttgcccttgagaaactaataagttaataaaactaagacctctaa
aaaaaaaaagttaataaaactaatatgaatattctctaaacaaaaataaaaactaagaagaatat
atthttgcttattttaccagaaaaatactttgcttagtcaaaagaagaagaatatgtgaatta
atthgatactgatgatttttaagctgtagatatttacgtatttagttaaaaaataacaatt
attatataatttaattgggtgtgtctattcaagtgtttaacttaagttgagggtttattcttatg
ttactaagttggagtgaggagaagactatthgcttgggaggagggaacgcccagtagaatgt
gttattatthttttttttttttgttaaggagtagagtggtgttatgttgcttgaataatthtttt
ttgtaggataatgtattagacaaataaatttggaacacgacctgtcaaagagtacacggt
aaaggggggtggtatacaaaagagtgcgctcgctctattcttcagggtcatttggtttgctacag
tttaggaaatttgaggagaaagaaataacagactgtataacgtcaaagaatgctcggttatt
cagggtggtagataagattaagtttcttgcttttgcatgggtgaaggcaaagtttgcttctct
tccattcaattaccatgggtggcggcttagtccgtttaccatactggacataggctaagagt
ttttcttttctcgtttttccattacaagttctttatgtaaatactgttttgactttgggtgtt
cttcccttagtacaccttggtgctaggaaggactatthtgatttggtaatatatttcatttta
acctcttaaaaaaaaaatcaggaaaagaaaaagataaaaggtcggaagtgttacctgattataa
aataaatgattaaattgaaaataaagataaataactaaaatgttttctataattaagttaag
agatgaaatatgtaattttcccaattatatattatgtaagtttttattttattttatatacgt
tgthtttgctttgaaatttgagtggtcttgaggagagaaaaacaaaagagaaaagaaaaatt
aatagtagatgcaataatthtgtagtccaaataataatatagttttctttaaaaataatat
catccaaactcatacattaaaaatattattcaaatttatgtcacgtcacaatgagaaaaaat
ggcccaacgaccttgattacacatcatcgatcatcatctaaagtctaaacaatacatct
tcttttctataaaatacaagactcaactccactcataaatcacacaggcaaacaattaactt
cttaatagtttggtattttcacacattag

CABINET REGIMBEAU

ORIGINAL

FIGURE 4

GATCCGGCTTCAATTGAGGAAATTAGAAACGCTCAACGTGCCAAGGGTCCGGCCACCATC
CTAGCCATTGGCACAGCTACTCCCGACCACTGTGTCTACCAGTCTGATTATGCTGATTAC
TATTTTCAGAGTCACTAAGAGCGAGCACATGACTGAGTTGAAGAAGAAGTTCAATCGCATA
Tgtaagtatatataattcatgcattaattcttacattcacaacatttctatacatatacga
gtgtgctattaagtgaggggtcacctccaagtgaatgaatgtttcaagcttagagaatagc
ttttagctaaattacttttaggaaacttgaaaatcattttacatcagtaaccgatattcct
ttcatttgattgtaagggcttgaagagctgttctttgaatcatgtagcattgctagctat
aattaagaataaaccttttataatttcttcaatgttaaatgcatgttgatcatcttcaaga
atatactatatgactagtcggttggaactaatgtgttcatcttatttcttttacaggGT
GACAAATCAATGATCAAGAAGCGTTACATTCAATTTGACCGAAGAAATGCTTGAGGAGCAC
CCAAACATTGGTGCTTATATGGCTCCATCTCTCAACATtACGCCAAGAGATTATCACTGC
TGAGGTACCTAAACTTGGTAAAGAAGCAGCATTGAAGGCTCTTAAAGAATGGGGTCAACC
AAAGTCCAAGATCACCCATtCTTGTTATTTTGTACAACCTCCGGTGTAGAAATGCCCGGTG
CAGATTACAAACTCGCTAATCTCTTAGGCCTTGAAACATCGGTTAGAAGGGTGTCTTGT
ACCATCAAGGTTGCTATGCAGGTGGAACGTCTTTCGAACTGCTAAGGATCTTGCAGAAA
ATAACGCAGGAGCACGAGTTCTTGTTGGTGTGCTCTGAGATCACTGTTGTTACATTTCTGTG
GGCCTTCCGAAGATGCTTTGGACTCTTTAGTTAGGTCAAGCCCTTTTGGTGATGGGTCA
GCAGCTGTGATTGTTGGATCAGATCCAGATGTCTCCATTGAACGACCCCTCTTCCAACCTT
GTTTCAGCAGCACAAACGTTTATTCCTAATTCAGCAGGTGCTATTGCGGGTAACTTACGT
GAGGTGGGACTCACCTTTCACTTGTGGCCTAATGTGCCTACTTTGATTTCGAGAACATA
GAGAAATGCTTGAATCAGGCTTTTGACCCACTTGGTATTAGCGATTGGAACCTCGTTATTT
TGGATTGCTCACCCCTGGTGGCCCTGCAATTCTTGATGCAGTTGAAGCAAACTCAATTTA
GAGAAAAAGAAACTTGAAGCAACAAGGCATGTGTTAAGTGAGTATGGTAACATGTCTAGT
GCATGTGTCTTTGTTTATTTTGGATGAGATGAGAAAGAAATCCCTAAAGGGGGGAAAAAGC
TATCCACAGGTGACGGATTGGATTGGGGGTACTATTTCGGTTTTGGGCCAGGCTTGACCAT
TGAGACCGTTGTGCTGCATAGCGTTCCTATGGTTACAAATTGAgtggaacaggttaagag
aaatgatataaggggacatgtcttattgtattatcagaggaggtgctacgaaagatatgta
catgtatcttcaaagttaataattagtagtactcctaaatcttttatctctatcctaacattg
agggattgtaatttagtgattgttggaggggtgcagtcacgtcaggcaagtggatgaaact
gcaagtgttgtcattctgttatcgggggatcatccatcacactggcgccgctcgagca
tgcatt

CABINET REGIMBEAU

ORIGINAL

FIGURE 5

gaattcttcaaaaaaaaaagttgccccttgagaaactaataagttaataaaactaagacctct
 aaaaaaaaaagttaataaaactaatatgaatattctctaaacaaaaaataaaaactaagaaga
 atatattttgcttatttaccagaaaaatactttgcttagtcaaaagaagaagaatattgt
 gaattaatttgatactgatgatttttaaagctgtagatatttacgtatttagttaaaaaa
 atacaattatttatataatttaattggtggtgcttattcaagtgtttaacttaagttgaggtt
 tattcttatgttactaagttggagtgaggagaagaagactatttgcttgggaggaggaacgc
 ccagtagaatgtgttattattttttttttttgttaaggagtagagtggttattgttgc
 tgaataattttttttgtaggataatgtattagacaaaataaatttggaacacgaccctg
 tcaaagagtacacggttaaagggggtggtatacaaaagagtgcgtcgctctattcttcagg
 tcatttggtttgctacagtttaggaaatttgaggaggaagaataaacagactgtataacg
 tcaaagaatgctcgggtatttcaggtggttagataagattaagtttcttgcttttgcatggg
 tgaaggcaagtttgcttctcttccattcaattaccatgggtggcggcttagtccggtta
 ccatactggacataggctaagagtttttctttctcgtttttccattacaagttctttat
 gtaaatactgttttgactttggtggttcttcccttagtacaccttggtgcttaggaaggacta
 ttttgatttggtaatatatttcattttaacctcttaaaaaaaaaatcaggaaaagaaaaag
 ataaaggtcgggaagtgttacctgattataaaataaatgattaaattgaaaataaagataa
 ataactaaaatgttttctataattaagtttaagagatgaaatatgtaattttcccaattat
 atattatgtaagtttttattttattttatatacgttggttttgctttgaaatttgagtggc
 ttggaggagagaaaaacaaaagagaaaaagaaaaatataatagtagatgcaataattttgtt
 agtccaaataataatatagttttctttaaaaataatatcatccaaactcatacattaaaa
 atattattcaaatttatgtcacgtcacaatgagaaaaaatggcccaacgaccttgatta
 cacatcatcgatcatcatctaaagtctaacaatacatcttcttttccctataaataca
 agactcaactccactcataaatcacacaggcaacaattaacttcttaatagtttgttat
 ttcacacatttagggccagATGGAGGATCCGGCTTCAATTGAGGAAATTAGAAACGCTCA
 ACGTGCCAAGGGTCCGGCCACCATCCTAGCCATTGGCACAGCTACTCCCGACCACTGTGT
 CTACCAGTCTGATTATGCTGATTACTATTTTCAAGAGTCACTAAGAGCGAGCACATGACTGA
 GTTGAAGAAGAAGTTCAATCGCATATGtaagtatatatattcatgcattaattcttacat
 tcacaacatttctatacatatacagagtgtgctattaagtgaagggtcacctccaagtgaat
 gaatgtttcaagcttagagaatagcttttagctaaattactttaggaaacttgaaaatca
 ttttacatcagtaaccgatattcctttcatttgattgtaagggttggaagagctgttctt
 tgaatcatgtagcattgctagctataattaagaataaccttttataatttcttcaatgtt
 aaatgcattgtgatcatcttcaagaataactatactatgactagtcgttggaactaaatgt
 gttcattcttatttctttacaggGTGACAAATCAATGATCAAGAAGCGTTACATTCATTT
 GACCGAAGAAATGCTTGAGGAGCACCCAAACATTGGTGCTTATATGGCTCCATCTCTCAA
 CATtACGCCAAGAGATTATCACTGCTGAGGTACCTAAACTTGGTAAAGAAGCAGCATTGA
 AGGCTCTTAAAGAATGGGGTCAACCAAAGTCCAAGATCACCCATtCTTGATTTTGTACA
 ACCTCCGGTGTAGAAATGCCCGGTGCAGATTACAACTCGCTAATCTCTTAGGCCTTGAA
 ACATCGGTTAGAAGGGTGATCTTGATACCATCAAGGTTGCTATGCAGGTGGAAGTGTCTT
 CGAACTGCTAAGGATCTTGAGAAAATAACGCAGGAGCACGAGTTCTTGTTGGTGTGCTCT
 GAGATCACTGTTGTTACATTTCTGTGGGCCTTCCGAAGATGCTTTGGACTCTTTAGTTAGG
 TCAAGCCCTTTTGGTGATGGGTGAGCAGCTGTGATTGTTGGATCAGATCCAGATGTCTC
 CATTGAACGACCCCTCTTCCAACCTTGTTTCAGCAGCACAAACGTTTATTCCTAATTCAGC
 AGGTGCTATTGCGGGTAACCTACGTGAGGTGGGACTCACCTTTCACTTGTGGCCTAATGT
 GCCTACTTTGATTTCCGAGAACATAGAGAAATGCTTGAATCAGGCTTTTGACCCACTTGG
 TATTAGCGATTGGAACCTCGTTATTTTGGATTGCTCACCCCTGGTGGCCCTGCAATTCTTGA
 TGCAGTTGAAGCAAACTCAATTTAGAGAAAAAGAACTTGAAGCAACAAGGCATGTGTT
 AAGTGAGTATGGTAACATGTCTAGTGCATGTGTCTTTGTTTATTTTGGATGAGATGAGAA
 AGAAATCCCTAAAGGGGGGAAAAAGCTatCCACAGGTGACGGATTGGATTGGGGGTACTAT
 TCGGTTTTGGGCCAGGCTTGACCATTGAGACCGTTGTGCTGCATAGCGTTCCCTATGGTTA

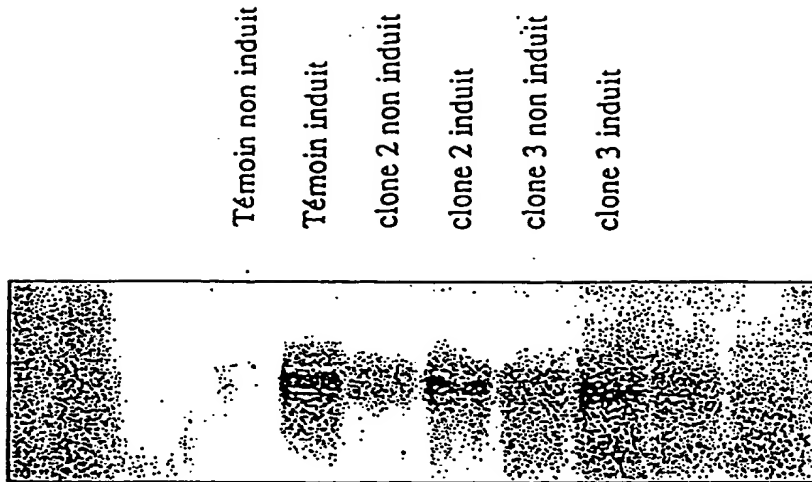
100% Identity
 100% Identity

FIGURE 5 (suite 1)

CAAATTGAgTggaaaacggtaagagaaatgatataggggacatgtcttattgtattatca
gaggaggtgctacgaaagatatgtacatgtatcttcaaagttaataattagtactcctaa
atctttttattcctatcctaacattgagggattgtaatttagtgattggtggaggggtgcag
tcacgtcaggcaagtggatgaaactgcaagtgcttgtcattctgttatcgggggatcatc
catcacactggcgccgctcgagcatgcat

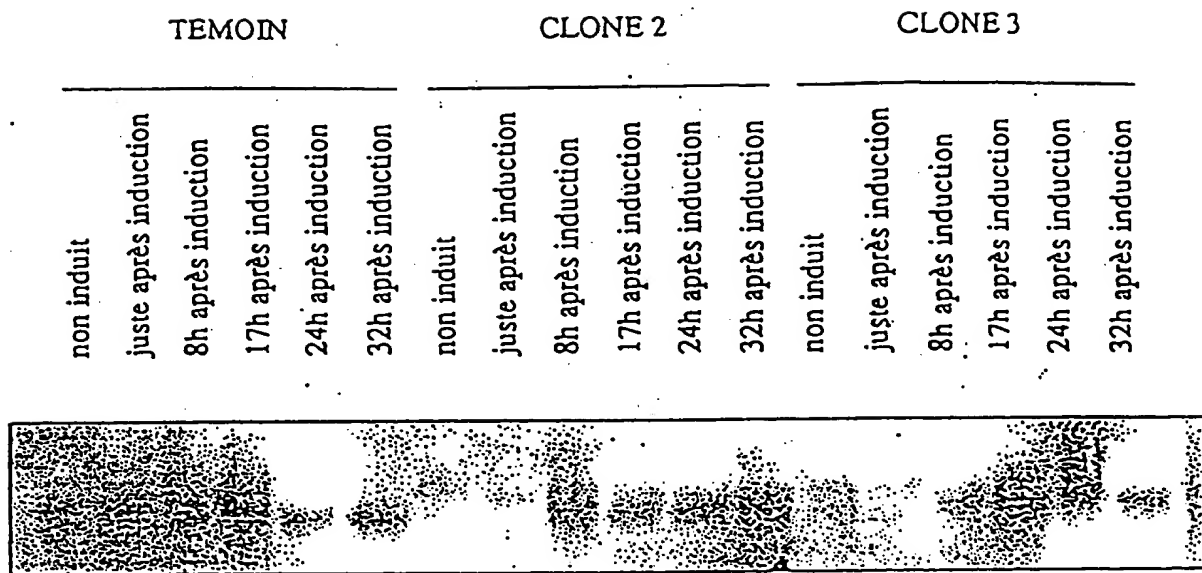
CABINET REGIMBEAU
ORIGINAL

FIGURE 6



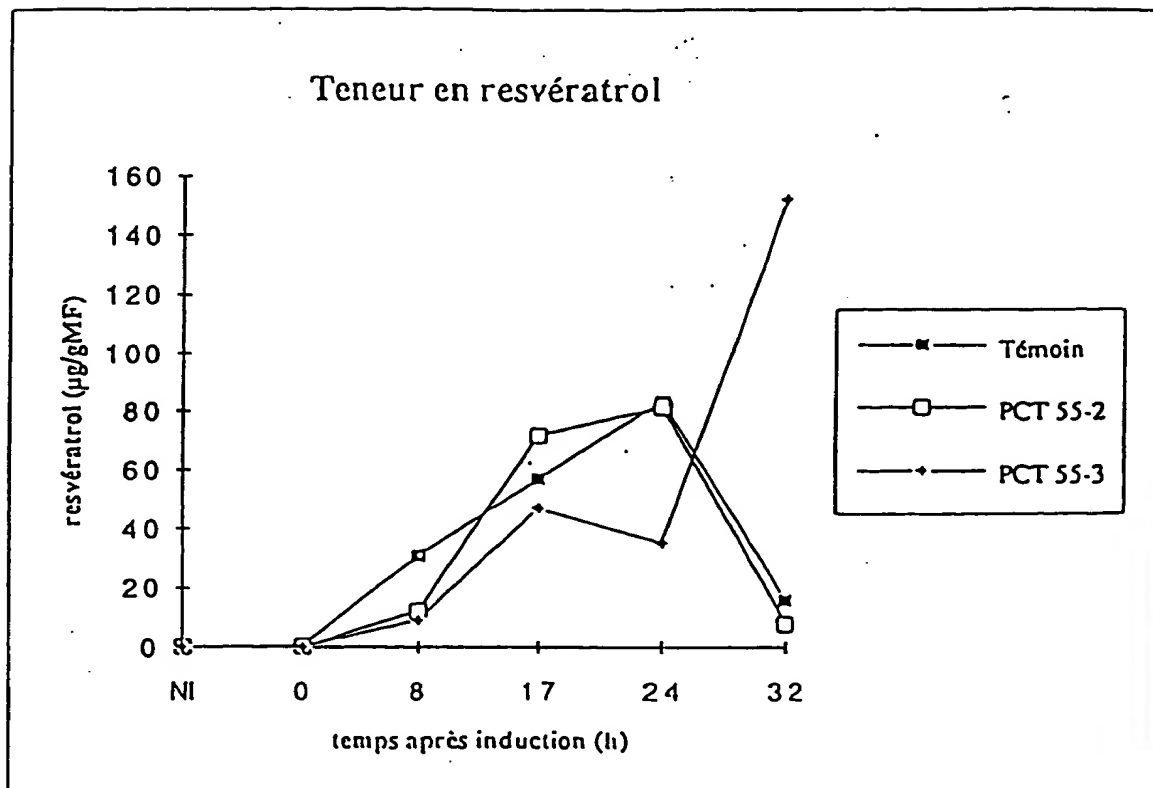
LABORATOIRE
ORIGINAL

FIGURE 7



107-27-10-10

FIGURE 8

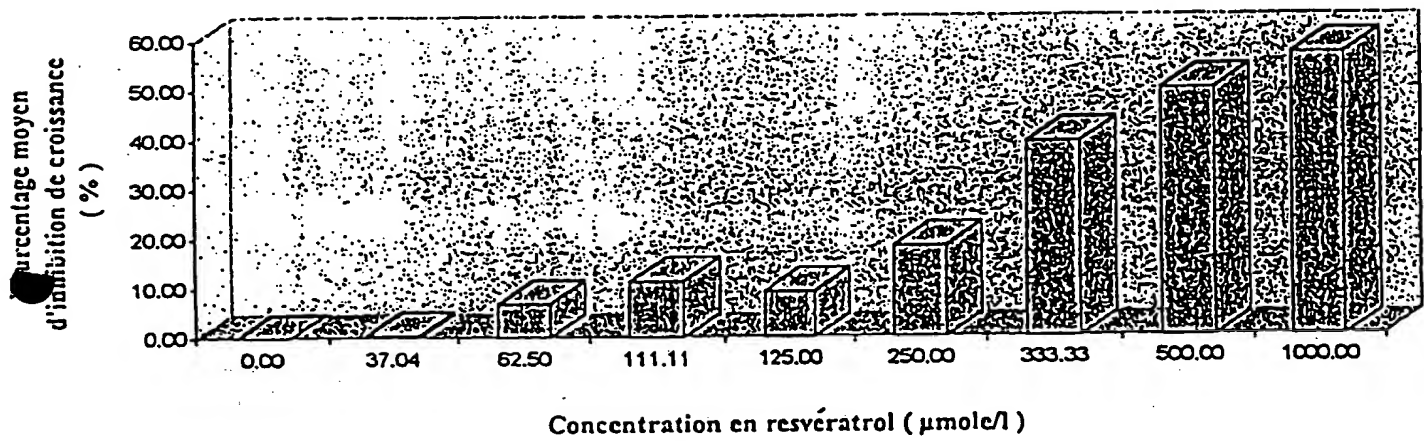


CABINET RÉGIMBEAU

ORIGINAL

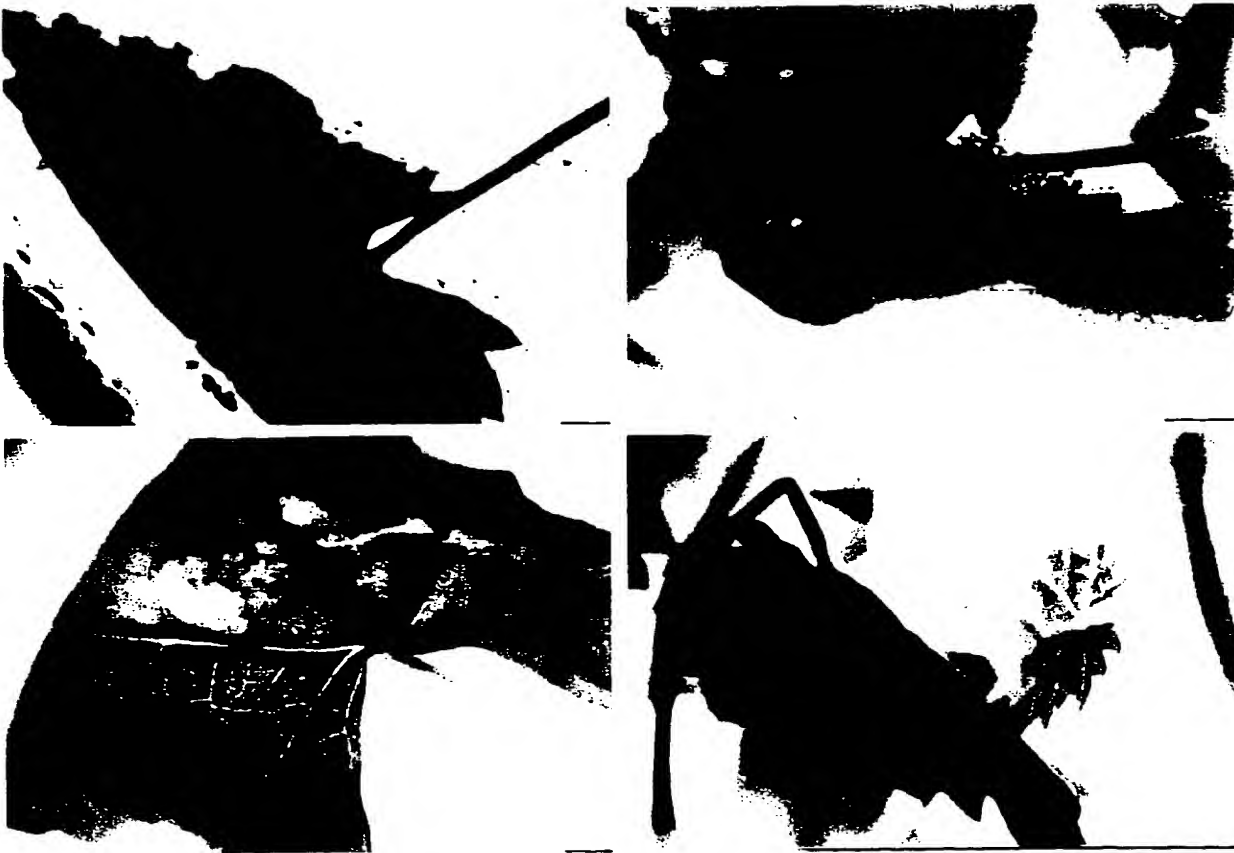
FIGURE 9

Inhibition de croissance du mycélium de *Botrytis cinerea* 916 t, après 7 jours à 20°C



WIMET REUMBEAU
ORIGINAL

FIGURE 10 : Planche Photo 1



12/14

FIGURE 11 : Planche Photo 2



FIGURE 12 : Planche Photo 3

